



**LAPORAN HIBAH PENELITIAN
PROYEK DUE LIKE BATCH III**

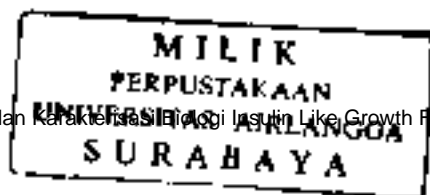
**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BIOLOGI INSULIN LIKE GROWTH
FACTOR I PLASMA SEMINALIS KAMBING SEBAGAI MEDIA PENCUCIAN
SPERMATOZOA (INOVASI TEKNIK PRODUKSI EMBRIO SECARA IN
VITRO)**

Oleh :

**Tatik Hernawati, MSi, Drh
Prof Dr. Soehartojo Hardjopranjoto, MS, Drh
Indah Norma Triana, MSi, Drh**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

010807141
Desember 2006



LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN Hibah PROYEK DUE LIKE BATCH III

1. Judul : Isolasi Dan Karakterisasi Biologi Insulin Like Growth Factor I
Plasma Seminalis Kambing Sebagai Media Pencucian Spermatozoa
(Inovasi Teknik Produksi Embrio Secara In Vitro)

2. Ketua Peneliti :

Nama lengkap dengan gelar : Tatik Hernawati, Msi, Drh.
Jenis Kelamin : Perempuan
Pangkat/Golongan : Pembina / IV a
NIP : 131 653 459
Jabatan : Lektor Kepala
Fakultas : Kedokteran Hewan

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan

Biaya yang diajukan : Rp. 30.000.000,-



Dr. Ismediono, MS, Drh

NIP. 130 687 297

Surabaya, 15 Desember 2006

Ketua Peneliti

Tatik Hernawati, MSi, Drh

NIP. 131 653 459



Tatik Hernawati, Ph.D

NIP. 131 801 627

KATA PENGANTAR

Puji syukur kita panjatkan kepada Allah SWT. yang telah melimpahkan rahmat dan hidayahNya sehingga dapat diselesaikannya penulisan hasil laporan penelitian dengan judul Isolasi dan Karakterisasi Biologi Insulin – Like Growth factor I Plasma Seminalis kambing Sebagai Media pencucian Spermatozoa (Inovasi Teknik produksi Embrio Secara In Vitro).

Pada kesempatan ini disampaikan terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga atas kepercayaannya mengabdikan proposal penelitian ini.
2. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.
3. Direktur Eksekutif LPIU DUE-LIKE Universitas Airlangga
4. Koordinator DUE-LIKE BATCH III Program Studi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
5. Tim Panitia Hibah Penelitian Proyek DUE-LIKE BATCH III Program Studi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Sebagai suatu karya manusia, sudah barang tentu ada beberapa kekurangan di beberapa laporan ini. Saran dan kritik yang konstruktif sangat diharapkan untuk kematangan peneliti sendiri agar laporan ini memberi manfaat kepada pihak-pihak yang berkepentingan.

Surabaya, Desember, 2006

Peneliti



DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN PENELITIAN.....	i
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
Bab.1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Dasar Penelitian	3
1.3. Rumusan Masalah	4
1.4. Hipotesa Penelitian	5
Bab.2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Tinjauan Insulin Like Growth Factor – I	6
2.2. Fisiologi Semen Kambing	7
2.3. Morfologi Spermatozoa	8
2.4. Fisiologi Plasma Seminalis	10
2.5. Struktur dan Fungsi Membran Spermatozoa	12
2.6. Sentrifugasi Semen Kambing	14
2.7. Pengaruh Sentrifugasi Terhadap pembentukan Senyawa Oksigen Reaktif (ROS).....	17
2.8. Pengaruh ROS Terhadap Fungsi Spermatozoa	18
2.9. Tinjauan Tentang Elektrofesis	20
Bab.3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	22
3.1. Tujuan Penelitian	22
3.2. Manfaat Penelitian	22
Bab.4. METODE PENELITIAN	24
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	24
4.2. Bahan dan Alat Penelitian Tahap I.....	24
4.2.1. Bahan Penelitian	24
4.2.2. Alat Penelitian	26
4.3. Kerangka Operasional Penelitian Tahap I.....	27
4.4. Tahapan Penelitian	28
4.4.1. Koleksi Semen dan Purifikasi Protein	28
4.4.2. Identifikasi Protein Insulin Like Growth Factor – I dengan Metode Native Page	29
4.4.3. Isolasi Protein Insulin Like Growth Factor – I dengan Metode Elektroelusi	30
4.4.4. Penentuan Massa relatif protein plasma seminalis.....	30
4.4.5. Penentuan kadar protein IGF I dengan metode Biuret	31

4.4.6. Karakterisasi Protein Like Growth Factor – I dengan Metode Western Blot	31
4.5. Tahapan Penelitian Tahap II	32
4.5.1. Rancangan Penelitian	33
4.5.2. Kerangka Operasional Penelitian Tahap II	34
4.5.3. Variable Penelitian	34
4.5.4. Definisi Operasional Penelitian	34
4.5.5. Bahan dan Alat Penelitian	35
4.5.5.1. Bahan Penelitian	35
4.5.5.2. Alat-alat Penelitian	35
4.5.6. Prosedur Pengumpulan Data	36
4.5.6.1. Pengumpulan sampel	36
4.5.6.2. Pencucian spermatozoa	36
4.5.6.3. Pemeriksaan motilitas spermatozoa	36
4.5.6.4. Pemeriksaan Hidup Mati Spermatozoa	37
4.5.6.5. Pemeriksaan membran Plasma Utah Spermatozoa	37
4.5.6.6. Pemeriksaan Keutuhan Tudung Akrosom Spermatozoa	37
4.5.6.7. Pemeriksaan kadar Malondialdehid (MDA)	38
4.5.6.8. Koleksi Oosit dan Pematangan Oosit In Vitro	39
4.5.6.9. Pengamatan Pembuhan In Vitro	40
4.6. Analisis Data	41
Bab 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	42
5.1. Penelitian Tahap I	42
5.1.1. Identifikasi IGF –I dengan Native PAGE 12%	42
5.1.2. Karakterisasi IGF-I dengan Western Blot	43
5.2. Penelitian Tahap II	44
5.2.1. Pemeriksaan makroskopis dan Mikroskopis	44
5.2.2. Persentase motilitas, hidup, MPU,TAU, kadar MDA	45
5.2.3. Persentase pembelahan embrio dan tingkat perkembangan embrio	46
5.2.3.1. Persentase pembelahan embrio	46
5.2.3.2. Persentase tingkat perkembangan embrio	47
Bab 6. KESIMPULAN DAN SARAN	50
6.1. Kesimpulan	50
6.2. Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	51

DAFTAR TABEL**Halaman**

Tabel 1. Rata-rata persentase motilitas, hidup, MPU, TAU dan Kadar malondialdehid (MDA).....	45
Tabel 2. Rata-rata persentase embrio yang membelah	46
Tabel 3. Rata-rata persentase tingkat perkembangan embrio ...	47

DAFTAR LAMPIRAN**Halaman**

Lampiran 1. Rata-rata persentase motilitas spermatozoa	57
Lampiran 2. Rata-rata persentase hidup spermatozoa	57
Lampiran 3. Rata-rata persentase malondialdehid (MDA)	58
Lampiran 4. Rata-rata persentase Membran Plasma Utuh	58
Lampiran 5. Rata-rata persentase Tudung Akrosom Utuh	59
Lampiran 6. Rata-rata persentase embrio yang membelah	59
Lampiran 7. Rata-rata persentase perkembangan embrio 2 sel	60
Lampiran 8. Rata-rata persentase perkembangan embrio 4 sel	60
Lampiran 9. Rata-rata persentase perkembangan embrio 8 sel	61
Lampiran 10. Rata-rata persentase perkembangan embrio 16 sel	61
Lampiran 11. Penghitungan Massa Relatif (Mr) IGF-1	62
Lampiran 12. Penghitungan Konsentrasi IGF-1 (Metode biuret).....	63

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Gel hasil analisis dengan Native PAGE 12 %.....	41
Gambar 2. Hasil Western Blot	43
Gambar 3. Spermatozoa hidup dan mati	64
Gambar 4. Spermatozoa yang mengalami Swelling	65
Gambar 5. Tudung Akrosom Spermatozoa	66
Gambar 6. Pembelahan embrio	67
Gambar 7. Tingkat perkembangan embrio	68



BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Bioteknologi reproduksi akhir-akhir ini menjadi topik yang sangat penting dalam meningkatkan produktivitas ternak. Bioteknologi reproduksi yang telah terbukti dapat meningkatkan produktivitas ternak adalah Inseminasi Buatan (IB) dan Transfer Embrio (TE) (Pasaribu dan Iman, S, 1992). Pada pembuahan In Vitro, spermatozoa harus mengalami kapasitasi seperti halnya pada kondisi alamiah. Pendewasaan spermatozoa (spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi) juga dapat dilakukan sebelum mampu dan berhasil melakukan pembuahan (Djojosoebagio, 1991).

Pembuahan In Vitro adalah suatu teknik pembuahan untuk memproduksi embrio secara buatan diluar tubuh induk betina. Agar pembuahan In Vitro dapat berhasil dengan baik ada beberapa hal yang perlu dilakukan yaitu sel telur hendaknya dibuahi dengan spermatozoa yang telah mengalami kapasitasi dengan jumlah spermatozoa berkisar antara 100 ribu sampai 10 juta permililiter semen. Sebelum semen dan sel telur dicampurkan, plasma seminalis dari semen harus dibuang dengan cara sentrifugasi, karena di dalam seminal plasma terdapat bahan-bahan yang dapat mengganggu kemampuan spermatozoa untuk membuahi (Hardjopranjoto, 1987).

Pada kondisi alamiah, spermatozoa akan mengalami kapasitasi pada saluran reproduksi betina sebelum proses pembuahan, tepatnya mendekati isthmus dari ovidukt. Oleh karena itu di dalam laboratorium, baik sperma yang diperoleh segar maupun beku perlu dilakukan kapasitasi sebelum dilakukan pembuahan In Vitro. Spermatozoa mamalia hanya dapat membuahi sel telur apabila telah berada di dalam saluran alat kelamin betina selama beberapa saat. Hal tersebut diperlukan karena spermatozoa pada saat itu sedang

melakukan reaksi kapabilitas. Kapabilitas dapat diartikan sebagai kemampuan spermatozoa membuahi sel telur (Djojosoebagio, 1991; Yanagimachi, 1988). Dapat juga diartikan sebagai suatu proses yang meliputi proses pembukaan reseptor, pelepasan inhibitor atau stabilisator dari permukaan spermatozoa (Suhana dan Rafiah, 1982). Jadi sebelum spermatozoa digunakan untuk melakukan pembuahan In Vitro spermatozoa harus terlebih dahulu mengalami kapabilitas In Vitro (In Vitro Capacitation).

Menurut Hunter (1995) salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan pembuahan In Vitro adalah motilitas spermatozoa . Tingkat gerak maju tinggi tampaknya sangat diperlukan untuk penetrasi membran sel telur In Vitro. Menurut Toelihere (1981), motilitas spermatozoa penting untuk melewati hambatan alamiah pada serviks dalam rongga pertemuan uterotubal, isthmus tuba falopii dan pada penetrasi spermatozoa ke dalam ovum pada proses pembuahan.

Dari hasil penelitian sebelumnya , pada pembuahan In Vitro, spermatozoa sebelum dicampurkan dengan sel telur, plasma seminalis dari semen harus dipisahkan lebih dahulu. Salah satu cara pemisahan plasma seminalis tersebut adalah dengan teknik sentrifugasi dari semen. Dampak buruk dari hasil pemisahan plasma seminalis dengan teknik sentrifugasi adalah adanya peningkatan pembentukan Reactive Oxygen Species (ROS) oleh spermatozoa. Agarwal, et al (2003) menemukan peningkatan akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa manusia secara bermakna ketika spermatozoa disentrifugasi dengan beberapa kali putaran. Menurut penelitian Dasrul (2005) dalam penelitiannya menyimpulkan bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat meningkatkan akumulasi ROS , peroksidasi lipid dan penurunan kadar DHA membran serta kerusakan integritas membran spermatozoa kerbau

Lumpur. Hasil akhir yang paling penting dan peroksidasi lipid adalah Malondialdehid (MDA) (Dorota and Kurpisz, 2004). Begitu juga hasil penelitian Sardjito (2004), mengatakan bahwa proses sentrifugasi dengan kecepatan 1800 G, 2400 G dan 2800 G menunjukkan adanya peningkatan kerusakan membran spermatozoa yang mengakibatkan daya tahan hidup spermatozoa menjadi menurun. Bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralisir oleh sistem pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa atau seminal plasma dapat menyebabkan kerusakan asam lemak khususnya asam lemak poli tak jenuh yang merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran sel spermatozoa, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA, selanjutnya menyebabkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995).

1.2. Dasar Penelitian

Plasma seminalis dari semen terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik yang mengatur fungsi spermatozoa. Telah dilaporkan bahwa faktor-faktor yang terdapat di dalam plasma seminalis dapat mempengaruhi viabilitas spermatozoa. Plasma seminalis dapat memelihara motilitas spermatozoa padasapi dan domba serta viabilitas spermatozoa domba. Komponen biokimia dari plasma seminalis dapat memperbaiki integritas membran spermatozoa domba pada keadaan cold shock (Macpherson,et al, 2000). Beberapa penelitian biomolekuler mengatakan bahwa , dengan penambahan beberapa protein saja dapat memperbaiki proses fertilisasi tetapi juga dapat mempertahankan kehidupan sel. Salah satu komponen plasma seminalis adalah Insulin – Like Growth Factor-I (IGF-I) Insulin Like Growth Factor-1 berbentuk kompleks yaitu

berikatan dengan molekul lain yang terdiri dari 3 molekul protein yaitu satu molekul IGF-I (subunit α), satu molekul IGFBP (subunit β) dan satu molekul Acid Label Subunit (subunit γ) dengan berat molekul 150 kDa (Z Kostecha and J Blanovec, 1999). Pada plasma seminalis manusia, sapi terdiri dari IGF-I , IGF-II dan IGFBP. Menurut Birkenmeier, et al (1996), IGF-I dalam plasma seminalis dapat mempengaruhi perkembangan sel germinatif dan mengatur fungsi spermatozoa sebelum dan sesudah ejakulasi terutama dalam meningkatkan motilitas dan kapasitas. Dengan demikian IGF-I dapat menambah motilitas spermatozoa dengan mengatur pergerakan sel. Menurut penelitian Donald, et al (2002) membuktikan bahwa penambahan IGF-I pada spermatozoa sapi secara In Vitro menghasilkan peningkatan motilitas spermatozoa. Insulin Like Growth Factor -I bila diberikan pada tikus yang mengalami deficiency growth hormon akan meningkatkan motilitas dan memperbaiki morfologi pada spermatozoa yang belum matang (Birkenmeier, et al, 1996).

Atas dasar kenyataan diatas maka sangatlah penting untuk melakukan penelitian tentang isolasi dan karakterisasi biologi IGF-I plasma seminalis kambing sebagai media pencucian spermatozoa

1.3. Rumusan Masalah

- a. Apakah terdapat peningkatan persentase motilitas spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara invitro.
- b. Apakah terdapat peningkatan persentase spermatozoa hidup pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara invitro.
- c. Apakah terdapat peningkatan persentase membran plasma utuh spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.

- d. Apakah terdapat peningkatan persentase keutuhan tudung akrosom spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- e. Apakah terdapat penurunan konsentrasi malondialdehid (MDA) spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- f. Apakah terdapat peningkatan persentase pembelahan embrio secara in vitro pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing.
- g. Apakah terdapat peningkatan persentase perkembangan embrio secara in vitro pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing.

1.4. Hipotesis Penelitian

- a. Terdapat peningkatan persentase motilitas spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara invitro.
- b. Terdapat terdapat peningkatan persentase spermatozoa hidup pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara invitro.
- c. Terdapat peningkatan membran plasma utuh spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- d. Terdapat peningkatan persentase keutuhan tudung akrosom spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- e. Terdapat penurunan konsentrasi MDA spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- f. Terdapat peningkatan persentase pembelahan embrio secara in vitro pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing .
- g. Terdapat peningkatan persentase perkembangan embrio secara in vitro pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Insulin Like Growth Factor I (IGF -I)

Growth factor adalah polipeptida yang bekerja sebagai pengatur sistem paracrin, autocrine dan endocrine pada pertumbuhan dan diferensiasi sel (Clemmons, Dr and Jones, J.I, 1995). Berdasarkan perbedaan struktur aktifitas biologisnya, growth factor diklasifikasikan menjadi 1). *Epidermal Growth Factor* (EGF), 2). *Fibroblast Growth Factor* (FGF), 3) *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), 4) *Transforming Growth Factor* (TGF - β), 5) *Haemopoietic Growth Factor* (Cytokines) (Monget, et al, 1993).

Insulin Like Growth Factor -I (IGF-I) merupakan glikoprotein yang terdiri dari kombinasi molekul dengan berat molekul 85 kDa, binding protein dengan berat molekul 53 kDa dan IGF yang membentuk kompleks. Pada spesies primata tingkat tinggi, kompleks protein tersebut ditemukan di cairan amnion, cairan cerebrospinal dan plasma seminalis (Baxter, R.C, 1990). Insulin Like Growth Factor -I dengan berat molekul 150 kDa juga ditemukan di dalam plasma semina kelinci yang mempengaruhi fungsi sperma (Minelli, A, et al ; 2001). Insulin Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP) merupakan suatu growth hormon dependent yang mempunyai afinitas yang tinggi dan dapat berfungsi sebagai inhibitor atau aktivator sintesa IGF - I (Kostecha, J. Blanovec, 1999) yang mempunyai berat molekul antara 47 – 53 kDa (Robert, C, et al ; 1989) dan secara umum IGFBP sebagai salah satu pengatur fungsi dan aktifitas IGF (Anasta, et al, 2000). Berat molekul IGFBP tergantung dari tingkat glikosilasi. Dalam bentuk terghikosilasi mempunyai berat molekul 54 kDa, sedang dalam bentuk tidak terghikosilasi mempunyai berat molekul 29,5 kDa. Hanya IGFBP - 3 yang

terglikosilasi saja yang berkaitan dengan permukaan sel. IGFBP – 3 juga terdapat di dalam cairan cerebrospinal manusia, cairan limfe tikus, susu dan colostrum tikus, susu dan colostrum tikus dan babi, plasma seminalis manusia dan cairan amnion (Kostecha, J. Blanovec, 1999). Pada manusia IGF dikenal dengan sebutan Somatomedins (Robert, C, et al; 1989) dan hampir 80% di dalam sirkulasi, IGF – I dibawa oleh IGFBP – 3 suatu ternary kompleks yang terdiri dari satu molekul IGF – 1, satu molekul IGFBP-3 dengan berat molekul 47 – 53 kDa, satu molekul ALS dengan berat molekul 88 kDa (Laron, Z, 2001).

Insulin Like Growth Factor – I adalah suatu peptida yang terdiri dari 70 asam amino dengan berat molekul 7649 Da . Sama dengan insulin, IGF – I mempunyai rantai A dan B yang dihubungkan dengan rantai disulfida (Laron, Z, 2001). Dari 70 asam amino ,IGF – I tersebut, 29 asam amino homolog dengan insulin rantai B, 12 asam amino analog dengan proinsulin C peptida dan 21 asam amino homolog dengan insulin rantai A, sedangkan 8 asam amino lainnya tidak mempunyai fungsi yang sama dengan insulin (Gill, et al, 1999).

2.2. Fisiologis Semen Kambing

Semen atau disebut dengan air mani dari suatu spesies hewan mempunyai perbedaan dalam sifat-sifatnya dengan spesies lain. Perbedaan ini terletak dalam volume, kekentalan, pH, konsentrasi, warna dan baunya (Hardjopranjoto, 1995). Semen adalah hasil sekresi kelamin jantan secara normal yang diejakulasikan ke saluran kelamin betina pada waktu kopulasi atau ditampung dengan berbagai cara untuk keperluan inseminasi buatan (Hafez, 2000). Semen terdiri dari dua bagian yaitu plasma semen dan

spermatozoa atau sel kelamin jantan. Plasma semen diproduksi oleh kelenjar-kelenjar epididimis, vas deferens, vesica seminalis, prostat, kelenjar bulbourethralis (Cowper's) dan kelenjar urethra, sedangkan spermatozoa diproduksi di dalam tubulus seminiferus testis melalui proses spermatogenesis. Selama proses spermatogenesis materi nukleus spermatid didapatkan membentuk kepala spermatozoa, sitoplasmanya direduksi dan berubah menjadi bagian tengah dan ekor. Organel sel kompleks golgi membentuk kap diatas nukleus dan dinamakan akrosom. Plasma semen kambing mengandung gliseril fosforil kolin dalam kadar yang tinggi dibanding sapi, babi dan kuda. Semen kambing mengandung spermatozoa sebanyak sepertiga bagian dan dua bagian adalah plasma semen (Hardjopranjoto, 1981). Plasma semen mengandung berbagai persenyawaan organik termasuk fruktosa, asam sitrat, sorbitol, inositol, gliseril fosforil kolin, ergotionin, phospholipid, prostaglandin, asam amino dan asam oksalat. Fruktosa merupakan karbohidrat yang siap dimanfaatkan oleh spermatozoa sebagai sumber energi utama. Plasma semen kambing mengandung enzim fosfolipase A dari kelenjar bulbourethralis yang dapat mengkoagulasikan lesitin dari kuning telur pada bahan pengencer (Evans and Maxwell, 1987).

2.3. Morfologi Spermatozoa

Pembentukan spermatozoa terjadi didalam testes khususnya didalam tubulus seminiferus. Selama spermatogenesis materi nukleus spermatid di dapatkan membentuk kepala spermatozoa, sitoplasmanya direduksi dan berubah menjadi bagian tengah dan ekor. Organel sel kompleks golgi membentuk kap diatas nukleus dan dinamakan reaksi akrosom (Bambang , 2003).

Spermatozoa merupakan sel berukuran kecil, kompak dan sangat khas, yang tidak bertumbuh dan membagi diri. Spermatozoa mempunyai struktur yang cukup padat dan tidak mudah terdispersi kecuali membran plasma (Polakoski dan Zaneveld, 1976). Secara morfologis spermatozoa terdiri dari tiga bagian yaitu bagian kepala, leher dan ekor. Sedangkan bagian ekor terdiri dari bagian tengah (*midle piece*), bagian utama (*principal piece*) dan bagian ujung (*end piece*) (Hafez, 2000). Bagian kepala mengandung materi hereditas paternal dan ekor mengandung sarana penggerak suatu pembungkus menutup kepala spermatozoa dan dibawahnya terdapat akrosom yang mengandung banyak fosfolipid sedangkan bagian ekor dikelilingi oleh fibril yang lebih kasar (Lindsay,dkk, 1982). Spermatozoa tidak memegang peranan apapun dalam fisiologi hewan jantan tetapi melibatkan diri dalam proses pembuahan di dalam saluran alat kelamin betina untuk membentuk individu baru . Spermatozoa kambing memiliki panjang kepala 8 sampai 10 mikron, lebar 4 sampai 4,5 mikron dan tebal kepala 0,5 sampai 1,5 mikron. Pada bagian tengah (badan) spermatozoa mempunyai panjang 1,5 sampai 2 kali panjang kepala dengan diameter 1 mikron. Sedangkan panjang ekor spermatozoa adalah 35 sampai 45 mikron dengan diameter 0,4 sampai 0,8 mikron, sehingga panjang keseluruhan mencapai 50 sampai 70 mikron (Hafez, 2000).

Menurut Frandson (1992), inti ada di dalam kepala dan mempunyai ukuran kira- kira sepertiga panjang kepala, mengandung bahan genetik yang dibutuhkan pada saat membuahi sel telur. Inti spermatozoa mengandung kromosom yaitu separuh dari jumlah kromosom inti yang diploid pada sel somatik. Bagian tengah merupakan pusat tenaga spermatozoa karena adanya mitokondria di dalamnya. Ekor spermatozoa menyerupai flagellum. Dua sentriol terletak dalam bagian tengah (*midpiece*). Dari sini

fibril-fibril yang serupa dengan silia terentang dalam ekor. Terdapat dua fibril sentral yang dikelilingi oleh sebuah cincin yang terdiri dari 9 pasangan fibril perifer. Fibril-fibril ini bersifat kontraktile dan menimbulkan gerakan ekor spermatozoa. Fibril ini merupakan kerangka untuk berkontraksi dan berelaksasi, sama seperti kerjanya aktomiosin dari urat daging pada tubuh, yang menyebabkan gerakan ekor seperti cambuk dan mendorong spermatozoa bergerak kedepan di dalam cairan. Bagian leher juga mengandung sentriol proksimal sebagai pusat kinetik untuk mengawali koordinasi kontraksi selaput fibril yang menghasilkan gerak. Bagian badan ini banyak mengandung enzim dan bahan lipoid. Bagian ini berakhir pada cincin sentriol yang kemungkinan berfungsi mengkoordinir rentetan kontraksi-kontraksi dari serabut-serabut fibril itu. Ekornya yang berkurang garis tengahnya secara bertahap dari sambungan dengan bagian badan dicincin sentriol ke ujungnya, kira-kira panjangnya 40-44 mikron.

2.4. Fisiologi Plasma Seminalis

Bagian terbesar semen kambing adalah plasma seminalis yaitu sebesar 90% berupa sekresi dari kelenjar aksesoris. Plasma semen kambing mempunyai pH sekitar 7,0 dan tekanan osmotik sama dengan darah. Fungsi plasma semen adalah sebagai medium pembawa sperma dari saluran reproduksi hewan jantan ke dalam saluran reproduksi hewan betina. Fungsi ini dapat dijalankan dengan baik karena plasma seminalis mengandung bahan-bahan penyangga dan makanan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Ismudiono, 1996 ;Hafez, 2000). Plasma semen terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik mengatur fungsi spermatozoa. Senyawa-senyawa organik spesifik seperti fruktosa, asam sitrat, sorbitol, inositol,

glycerylphosphorylcholin (GPC), ergothionin dan prostaglandin (Partodihardjo, 1987). Sedangkan senyawa anorganik dalam seminal plasma diantaranya bikarbonat, kalium, kalsium dan natrium. Natrium dan kalium merupakan kation-kation utama dalam semen mamalia ,sedangkan kalsium dan magnesium dalam konsentrasi rendah. Konsentrasi kalium lebih tinggi di dalam sperma dan pada di dalam plasma semen sedangkan konsentrasi natrium adalah sebaliknya (Toelihere, 1985). Plasma seminalis juga mengandung asam askorbat, asam amino, peptida, protein , lipid, asam lemak, beberapa enzim, antimikroba yaitu Ig A dan beberapa hormon (Hafez, 2000). Telah dilaporkan bahwa faktor-faktor yang terdapat di dalam plasma seminalis mempengaruhi viabilitas, motilitas dan integritas membran spermatozoa pada domba dalam keadaan cold shock (Macpherson, dkk, 2000). Didalam plasma seminalis terdapat *Faktor Dekapasitasi* (DF) yang pada waktu ejakulasi melapisi permukaan spermatozoa , faktor tersebut secara progresif dilepaskan dari permukaan spermatozoa pada proses kapasitasi. Molekul-molekul tersebut adalah dua protein yaitu uteroglobin dan transglutaminase (Baldi,E, et al, 2000) serta spermin yang merupakan molekul yang mencegah kapasitasi dan reaksi akrosom lebih awal (Gordon, I, 1995). Faktor-faktor dekapasitasi tersebut akan mengikat permukaan spermatozoa , mengaktifkan kalsium intraseluler – ATP ase untuk mempertahankan konsentrasi kalsium intraseluler tetap rendah dan jika dilepaskan dari permukaan akan terjadi peningkatan kalsium (Baldi, E, et al, 2000). Didalam plasma semen juga terdapat D-fruktosa yang merupakan faktor untuk mempertahankan spermatozoa dalam keadaan tidak terkapasitasi (Gordon, I, 1995).

2.5. Struktur dan Fungsi Membran Spermatozoa

Spermatozoa diliputi oleh membran sel dari kepala sampai ekor yang mempunyai susunan sangat kompleks baik komposisi molekuler maupun secara fungsional. Membran spermatozoa tersusun dari 43% lipid (dua lapis fosfolipid), 48% protein dan 9% karbohidrat (Darnell, et al, 1990). Komposisi lipid membran terdiri dari fosfolipid, sterol, asam lemak, asam lemak poli tak jenuh yang rentan terhadap kerusakan yang dirangsang oleh adanya ROS (Dorota dan Kurpisz, 2004). Tingginya jumlah asam lemak poli tak jenuh khususnya Docosahexaenoic (DHA) yang terdapat di dalam membran plasma kemungkinan mengatur fluiditas membran spermatozoa dan spermatogenesis. Spingomyelin mempengaruhi proses kapabilitas, sedangkan demosterol akan hilang selama kapabilitas. Kolesterol diketahui juga mengatur fluiditas dan permeabilitas membran sel. Selama kapabilitas terjadi eflok kolesterol dan menyebabkan influk Ca^{++} . Bertambahnya konsentrasi Ca^{++} sangat penting mengatur reaksi akrosom.

Komponen membran spermatozoa mempunyai fungsi yang sangat unik dan spesifik seperti perlekatan spermatozoa dengan sel telur, transport substrat dan metabolisme. Fungsi – fungsi tersebut dilakukan oleh struktur yang secara morfologis terletak pada daerah – daerah tertentu seperti, membran pada bagian kepala berfungsi untuk penembusan sel telur pada proses fertilisasi (Nolan and Hammersted, 1997). Membran bagian belakang akrosom berfungsi mengadakan kontak pertama dan menjadi satu dengan oolema sel telur pada proses fertilisasi, sedangkan membran pada bagian ekor mempunyai fungsi untuk mendapatkan substrat untuk energi spermatozoa dan menghantar gelombang gerakan (Darnell, et al, 1990).

Fosfolipid merupakan komponen utama lipid membran spermatozoa yang membentuk membran lapis ganda kepala fosfolipid hidrofilik dan fosfolipid hidrofobik yang sangat penting kaitannya dengan fertilisasi. Diantara kedua lapisan tersebut protein globuler dan fibrous dengan distribusi yang bervariasi. Protein-protein ini berfungsi sebagai reseptor terhadap rangsangan eksternal dan sinyal (misalnya cahaya, aroma, hormon, obat-obatan, faktor penumbuh dan transporter, sebagai enzim dan antigen yang terlibat dalam pengenalan kepala spermatozoa (adesi zona pelusida-spermatozoa, induksi reaksi akrosom dan fusi spermatozoa-sel telur). Pada bagian luar dari kedua lapisan fosfolipid terhadap karbohidrat yang merupakan oligosakarida yang berikatan dengan protein dan membran lipid. Karbohidrat membran spermatozoa selain berfungsi sebagai sumber untuk pembentukan ATP, juga berperan penting dalam proses kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Herrero, dkk, 1999).

Sebagian besar fosfolipid membran spermatozoa mamalia mengandung asam lemak poli tak jenuh (*poly unsaturated fatty acide*) dalam konsentrasi yang tinggi. Asam-asam lemak poli tak jenuh ini penting untuk mempertahankan fluiditas membran plasma yang dibutuhkan untuk memelihara fungsi-fungsi biokimia dan biologis termasuk berbagai aktivitas enzim terikat membran dan peristiwa fusi yang terkait dengan reaksi akrosom dan penyatuan spermatozoa dan sel telur (Dorota dan Kurpisz, 2004). *Docosahexanoic acide* (DHA) merupakan asam lemak poli tak jenuh terpenting membran plasma spermatozoa yang selain untuk meregulasi fluiditas membran juga merupakan substrat utama dari peroksidasi lipid. Oksidasi DHA terikat fosfolipid juga ditunjukkan sebagai faktor utama yang menentukan lama hidup spermatozoa motil in

vitro (Alvarez dan Storey, 1984), menurunnya akrosom dan oksidasi DNA spermatozoa (Fraga, dkk, 1996).

Kolesterol merupakan komponen lipid membran yang mempunyai fungsi dalam mempertahankan fluiditas membran. Semakin banyak kandungan kolesterol pada membran akan membuat membran semakin cair, sebaliknya semakin sedikit kandungan kolesterol pada membran akan menyebabkan spermatozoa semakin mudah mengalami kerusakan (Dorota dan Kurpiz, 2004). Kandungan kolesterol pada membran akrosom lebih rendah dari pada membran plasma bagian ekor (Park dan Graham, 1992). Kolesterol membran selain penting untuk mempertahankan fluiditas membran juga penting dalam proses kapasitasi dan reaksi akrosom.

2.6. Sentrifugasi Semen Kambing

Semen merupakan cairan atau suspensi seluler semi gelatin yang terdiri dari gamet jantan atau spermatozoa dan sekresi dari organ asesoris saluran reproduksi jantan. Bagian cair dari suspensi ini terbentuk saat ejakulasi, disebut dengan plasma semen atau seminal plasma (Toelihere, 1985). Menurut Hinting (1989), mengatakan bahwa plasma semen mengandung bahan-bahan yang merusak daya pembuahan spermatozoa. Plasma semen juga mengandung mikroorganisme yang mencemari sistem kultur, dan juga limfosit yang menghasilkan sekresi beracun yang menghambat pembuahan. Agar dapat mencapai tujuan program fertilisasi in vitro maka spermatozoa harus dipisahkan dari seminal plasma dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan dan waktu tertentu.

Spermatozoa dari kepala sampai ekor diselaputi oleh membran sel, dengan struktur yang sangat kompleks dalam susunan mosaik yang teratur dan memiliki peran biologik spesifik pada permukaannya (Damel, et al, 1990). Berbeda dengan banyak tipe

sel lainnya, permukaan membran spermatozoa mempunyai polaritas yang tinggi dengan struktur daerah yang secara geografis jelas pembagiannya. Secara umum struktur membran spermatozoa tersusun dari 43% lipid, 48% protein, 9% karbohidrat dan zat-zat lain yang bergabung bersama secara non kovalen dan sangat sensitive terhadap faktor-faktor ekstrinsik seperti suhu, kekuatan ionik dan polantas pelarut (Park and Graham, 1992). Lipid merupakan komponen membran spermatozoa, yang berperan penting dalam menjaga stabilitas dan kelangsungan hidup spermatozoa secara keseluruhan, termasuk kemampuan spermatozoa untuk mengkapasitasi serta membuahi sel telur (Dorota and Kurpisz, 2004).

Hasil penelitian Fitri (2002), membuktikan bahwa keutuhan membran plasma spermatozoa setelah sentrifugasi dengan kecepatan 1000 G selama 10 menit adalah 22,2%. Kerusakan integritas membran spermatozoa setelah perlakuan pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll juga telah banyak dilaporkan oleh peneliti sebelumnya. Brandies and Manuel (1993) menemukan adanya penurunan persentase membran plasma utuh spermatozoa manusia yang bermakna setelah perlakuan pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinuus pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Demikian pula Susilawati (2000) membuktikan adanya kerusakan struktur membran spermatozoa yang diikuti dengan penurunan motilitas dan daya tahan hidup spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll 10 tingkat pada kecepatan 2250 rpm selama 5 menit. Akibat kerusakan struktur membran, maka sejumlah fungsi membran menjadi terganggu, hal ini dapat dilihat dari adanya peningkatan influks Ca^{2+} pada spermatozoa sapi, sebagaimana terlibat dengan

adanya pendaran warna kuning pada bagian kepala spermatozoa setelah pewarnaan dengan chlortetracycline (CTC) assay.

Sementara itu beberapa penelitian lain menemukan adanya peningkatan pembentukan *Reactive Oxygen Species* (ROS) oleh spermatozoa setelah pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll . Meningkatnya pembentukan ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diduga merupakan proses yang kompleks dan dapat berasal dari berbagai jenis reaksi kimiawi, organel maupun sel bahkan dapat berasal dari luar sel. Ada berbagai proses biologis yang dapat menjadi modulator pembentukan ROS oleh spermatozoa diantaranya kerusakan mekanik pada membran spermatozoa dan terpisahnya plasma seminalis dari spermatozoa (Aitken and Clarkson, 1990; Iwazaki and Gagnon, 1992). Adanya gesekan mekanik selama proses sentrifugasi menyebabkan deformasi matriks ekstraselluler dan perubahan konduktivitas membran spermatozoa (Phelp, et al, 1999) sehingga menyebabkan pemasukan ion Ca^{2+} ke dalam sel secara abnormal yang mengakibatkan konsentrasi di dalam sel meningkat. Peningkatan ion Ca^{2+} akan mengaktifkan enzim-enzim sehingga akan menghasilkan asam lemak yang berlebihan dan menghasilkan radikal superoksida anion (Halliwell and Outteridge, 1999).

2.7. Pengaruh Sentrifugasi Terhadap Pembentukan Senyawa Oksigen Reaktif (ROS)

Peningkatan pembentukan ROS oleh spermatozoa dengan sentrifugasi telah banyak dilaporkan oleh beberapa peneliti. Iwazaki and Gagnon (1992) menemukan adanya peningkatan akumulasi produksi ROS spermatozoa manusia 4 – 5 kali di atas kadar spermatozoa basal setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll diskontinuus selama 20 menit pada kecepatan 2000 rpm. Tingkat akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa setelah pemisahan dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dipengaruhi oleh lama dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan. Makin lama waktu dan kecepatan sentrifugasi yang digunakan makin tinggi akumulasi produksi ROS oleh spermatozoa. Lamanya sentrifugasi mempunyai peran yang lebih penting dari pada kecepatan sentrifugasi dalam menginduksi pembentukan ROS oleh spermatozoa (Agaerwal, et al, 1994; Shakarriz ,et al, 1995)

Meningkatnya akumulasi produksi ROS spermatozoa setelah sentrifugasi gradien densitas percoll dapat diakibatkan pula oleh hilangnya plasma seminalis dari spermatozoa. Penelitian Dasrul (2005) membuktikan bahwa pemisahan spermatozoa dengan sentrifugasi gradien densitas percoll dapat meningkatkan akumulasi ROS, peroksidasi lipid, penurunan kadar DHA membran serta kerusakan membran plasma spermatozoa kerbau lumpur. Hasil penelitian Iwazaki and Gagnon (1992) membuktikan bahwa pembuangan plasma seminalis dari spermatozoa melalui pembilasan berulang dengan sentrifugasi dapat meningkatkan pembentukan ROS oleh spermatozoa manusia 20 – 50 kali dari konsentrasi ROS spermatozoa basal. Akan tetapi penambahan kembali

plasma seminalis pada pellet spermatozoa akan menurunkan konsentrasi ROS spermatozoa sebanyak 70 – 80 %.

2.8. Pengaruh ROS Terhadap Fungsi Spermatozoa

ROS dalam konsentrasi normal diperlukan sebagai mediator penting terhadap fungsi spermatozoa dan terlibat dalam induksi hiperaktivasi, kapasitas dan reaksi akrosom serta fusi spermatozoa dengan sel telur. Namun demikian bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralkan oleh sistem pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa atau seminal plasma dapat menyebabkan kerusakan asam lemak khususnya asam lemak poli tak jenuh yang merupakan komponen penting dari fosfolipid penyusun membran sel spermatozoa, inaktivasi enzim-enzim glikolitik, pemutusan rantai DNA, selanjutnya menyebabkan penurunan motilitas dan kematian spermatozoa (Alvarez and Storey, 1995). Telah dilaporkan bahwa tingkat kerusakan membran oleh ROS bukan hanya bergantung pada sifat dan jumlah ROS yang dilibatkan tetapi juga bergantung pada momen dan durasi / lamanya paparan ROS serta factor-faktor lain seperti temperatur, tekanan oksigen dan komposisi lingkungan sekitarnya (Aitken, et al, 1994; Lamirande, et al, 1997).

Peroksidasi lipid merupakan salah satu proses yang menggambarkan terjadinya kerusakan oksidatif dari asam lemak poli tak jenuh sebagai konsekuensi dari peningkatan konsentrasi senyawa oksigen reaktif dalam sel atau organ. Aitken, et al (1998), menyatakan bila asam lemak poli tak jenuh bereaksi dengan radikal hidroksil (salah satu bentuk ROS) akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai yang dikenal dengan peroksidasi lipid. Oksidasi yang berlanjut dari rantai samping asam lemak dan

fragmentasi asam lemak ini akan menghasilkan komposisi kompleks lipid hydroksyperoxide dan produk akhir aldehid antara lain malondialdehid (MDA), 9-hidrosinonenal (HNE) dan berbagai hidrokarbon (etana/ C_2H_6 atau pentana/ C_5H_{12}) yang toksik terhadap sel dan dapat menyebabkan membran kehilangan integritas (Aitken, et al, 1994; Griveau and D.Le Lannou, 1997, Sudjarwo, 2001).

Malondialdehid (MDA), kadang disebut malonaldehid, merupakan salah satu golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi asam lemak poli tak jenuh yang mempunyai lebih ikatan rangkap seperti asam linolat, asam arakhidonat dan decoxahexahexanoid acid (DHA) membran. Oleh karena itu peningkatan kadar MDA dalam suspensi lazim digunakan sebagai salah satu indikator untuk peroksidasi lipid membran (Alvarez and Story, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999). Dalam kondisi fisiologis, malondialdehid dengan mudah menyerang protein dibandingkan dengan asam amino bebas, sehingga akan menghasilkan bermacam-macam residu seperti lisin. Kerusakan protein oleh serangan ROS bukan saja merusak fungsi enzim, tetapi juga mengganggu fungsi reseptor dan transportasi oleh protein. Kerusakan oksidatif protein dapat terjadi karena serangan langsung ROS atau akibat produk akhir peroksidasi lipid seperti MDA sehingga dapat merusak fungsi biologis protein (Widjaya, 1996). Bila kerusakan oksidatif terjadi pada protein fungsional seperti enzim-enzim glikolitik akan menyebabkan kehilangan aktivitas katalitiknya, sedangkan bila peroksidasi terjadi pada protein penyusun struktur membran sel, maka akan terjadi gangguan aktivitas membran seperti rusaknya reseptor dan berubahnya sifat permeabilitas membran (Hughes, et al, 1999).

Malondialdehid (MDA) mempunyai hubungan dengan infertilitas khususnya dengan motilitas, daya tahan hidup dan morfologinya. Adanya aktifitas ROS pada spermatozoa pasangan yang infertile juga dihubungkan dengan rendahnya antioksidan didalam seminal plasma (Lewis, et al, 1995). Sudjarwo, et al (2000) menyimpulkan bahwa terdapat hubungan negatif antara ROS dan motilitas, morfologi normal, jumlah spermatozoa dan SOD. Menurut hasil penelitian Tjokronegoro dan Mohamad (2002), menyimpulkan bahwa stress oksidative mempunyai hubungan dengan motilitas, morfologi, daya tahan hidup, kemampuan kapasitas dan bertambahnya kerusakan membran.

2.9. Tinjauan Tentang Elektroforesis.

Elektroforesis mempelajari perpindahan molekul yang bermuatan di medan listrik. Migrasi molekul dipengaruhi ukuran, bentuk, muatan dan komposisi kimia dari molekul. Elektroforesis relatif tidak mahal, teknik yang sering dipakai, dapat digunakan untuk analisis dan purifikasi beberapa tipe senyawa biomolekul yang berbeda dan khusus untuk protein dan nukleat (Boyer, 1993).

Elektroforesis modern menggunakan buffer jenuh sebagai tipe matriks gel pendukung medium. Sampel yang akan dianalisa tampak sebagai spot atau band tipis, disebut elektroforesis zone. Migrasi dipengaruhi oleh medan listrik dan kerapatan (rigid) dan matriks gel pendukung . Perbedaan antara berbagai metode adalah tipe media pendukung yaitu selulosa atau gel tipis. Selulosa digunakan sebagai media pendukung untuk senyawa biokimia yang mempunyai berat molekul kecil, misalnya asam amino dan

karbohidrat. Sedangkan poliakrilamid dan gel agarose digunakan sebagai media pendukung senyawa dengan berat molekul besar.

Elektroforesis gel poliakrilamid adalah gel yang dibuat dari polimerisasi akrilamid. Keuntungan elektroforesis ini adalah mempunyai kemampuan untuk memisahkan protein dan asam nukleat yang berukuran kecil dan yang relatif besar, interaksi antara molekul yang bermigrasi dengan matriks relatif kecil dan stabilitas fisik matrik. Kemampuan untuk memisahkan dan range ukuran molekul gel tergantung konsentrasi akrilamid dan bis akrilamid. Konsentrasi rendah akan membentuk pori yang besar dan digunakan untuk analisis senyawa dengan berat molekul yang besar dan sebaliknya bila konsentrasinya tinggi akan membentuk pori yang kecil dan digunakan untuk analisis senyawa dengan berat molekul yang kecil (Boyer, 1993).

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1 Tujuan Penelitian Jangka Panjang

Tujuan dari penelitian jangka panjang adalah untuk memperbaiki kualitas spermatozoa pada pembuahan in vitro serta dapat digunakan pada pembuatan semen beku

3.1.2 Tujuan Penelitian Jangka Pendek

Tujuan dari penelitian jangka pendek adalah :

- a. Untuk mengetahui persentase motilitas spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara invitro.
- b. Untuk mengetahui persentase spermatozoa hidup pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara invitro.
- c. Untuk mengetahui persentase membran plasma utuh spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- d. Untuk mengetahui persentase keutuhan tudung akrosom spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- e. Untuk mengetahui konsentrasi MDA spermatozoa pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing secara in vitro.
- f. Untuk mengetahui persentase pembelahan embrio secara in vitro pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing.
- g. Untuk mengetahui persentase perkembangan embrio secara in vitro pada paparan IGF-I plasma seminalis kambing .

3.2. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat dari penelitian ini adalah Insulin Like Growth Factor I sebagai medium pencucian sehingga pada proses fertilisasi in vitro di dapat embrio yang berkualitas



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1. Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomolekuler MIPA Universitas Brawijaya dan Laboratorium in vitro FKH Universitas Airlangga selama 6 bulan yaitu mulai bulan Juni sampai Desember 2006.

Penelitian ini terdiri dari dua tahap. Tahap I adalah penelitian kualitatif eksploratif karakterisasi IGF –I Komplek plasma seminalis kambing. Pada penelitian II dilakukan uji IGF-I komplek terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa hasil sentrifugasi

4.2. Bahan Dan Alat Penelitian Tahap I :

4.2.1. Bahan penelitian :

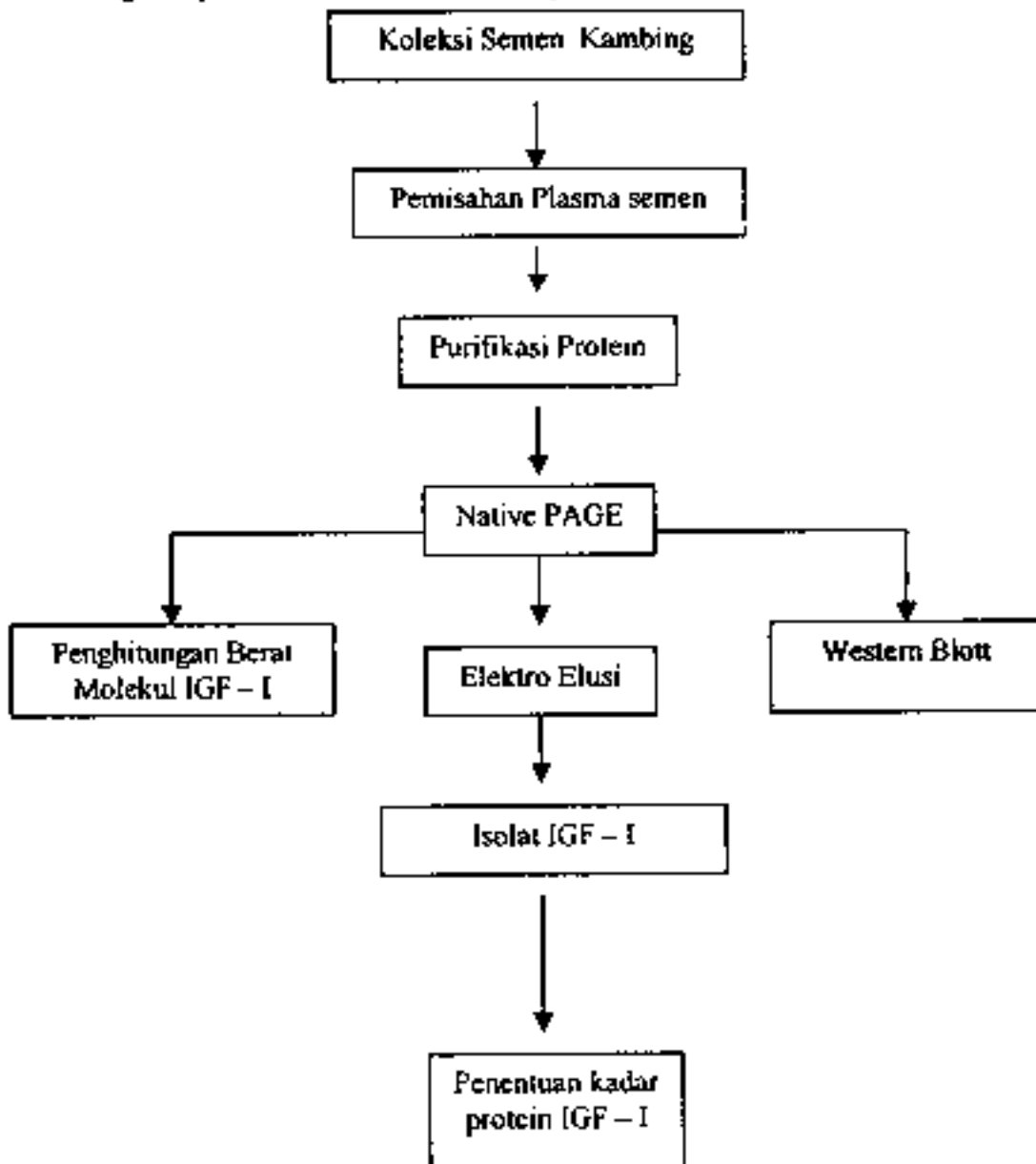
Persiapan sampel : kambing jantan peranakan etawa sebanyak 6 ekor untuk ditampung semennya. Bahan untuk isolasi dan purifikasi protein : Etanol dingin, Tris Cl. Running Buffer terdiri dari 3,03 g Tris, 14,4 glisin dan 1,0 g SDS dilarutkan dalam 1 liter akuades steril. Non Reducing Sample Buffer (Non RSB): 1ml 62,5 mM Tris HCl pH 6,8; 1,6 ml 10% gliserol; 1,6 ml 2% SDS, 0,4 ml 5% Iodoacetanol dan 0,2 ml 0,1% bromofenol blue kemudian diencerkan dalam 8 ml akuades steril. Separating gel 12% yang terdiri dari larutan Lower Gel Buffer pH 7,0 (1,82 g Tris; 0,04 g SDS dilarutkan dengan 5 ml akuades dan ditambahkan HCl sampai pH 7, kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril) Larutan Poliakrilamimida (T-Akrlil) terdiri dari 2,92 g akrilamida; 0,08 bisakrilamida dilarutkan dengan 7 ml akuades dengan menggunakan pengaduk magnetik, kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril. Larutan APS (Amonium persulfat) 10%(W/V) terdiri dari 0,5 g ammonium persulfat dilarutkan dalam 5 ml akuades,

divortex kemudian disimpan pada suhu 4° Celcius. N,N,N,N' - tetra methyl ethylene diamin (TEMED) dan dd H₂O. Stacking Gel terdiri dari larutan Upper Gel Bufer pH 7,0 (0,75 g Tris; 0,04 g SDS dilarutkan dengan 5 ml akuades dan ditambahkan HCl sampai pH 7, kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril). Larutan Poliakrilamimida (T-Akri) terdiri dari 2,92 g akrilamida; 0,08 bisakrilamida dilarutkan dengan 7 ml akuades dengan menggunakan pengaduk magnetik, kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril. Larutan APS (Amonium persulfat) 10%(W/V) terdiri dari 0,5 g ammonium persulfat dilarutkan dalam 5 ml akuades, divortex kemudian disimpan pada suhu 4° Celcius. N,N,N',N' - tetra methyl ethylene diamin (TEMED) dan dd H₂O. Bahan untuk Running Bufer terdiri dari 3,03 g Tris; 14,4 glisin dan 1,0 g SDS kemudian dilarutkan dalam 1 liter akuades steril. Marker High Range SDS-PAGE Standards (Bio-Rad) . Comassie Blue (Bio -Rad). Larutan staining Comassie blue terdiri dari 0,25 gram Coomassie Brilliant Blue R-250 , 45,4 ml metanol absolut, 9,2 ml asam asetat glasial dan akuades sampai 100 ml. Larutan Destaining terdiri dari 7 ml asam asetat glasial , 7 ml metanol absolut, akuades sampai 100 ml. Untuk Western Blot terdiri dari Kertas Whatman, membran nitroselulose, TBS (Tris Buffer Saline), BSA, TBS Tween, Antibodi primer, Antibodi sekunder. Bahan untuk pemeriksaan konsentrasi protein dengan metode Biuret terdiri dari 2,25 g Sodium potassium tartrate (NaKC₄O₆.4H₂O); 0,75 g Copper sulfate X 5 H₂O (CuSO₄.5H₂O) dan 1,25 g Potasium Iodide, kemudian dilarutkan dalam 100 ml 0,2 M Na OH (0,8 g/100 ml) , kemudian ditambahkan akuades sampai 250 ml.

4.2.2. Alat – alat Penelitian :

Alat-alat yang diperlukan pada penelitian ini meliputi vagina buatan, tabung skala, sentrifus dingin, gelas becker, erlenmeyer, mikropipet, eppendorf, seperangkat alat gel elektroforesis horizontal, Alat Elektroelusi , Western Blotter, Spektrofotometer Vis dan kuvet dari glass atau polystyrene

4.3. Kerangka Operasional Penelitian Tahap L



4.4. Tahapan penelitian pada penelitian tahap I adalah sebagai berikut :

1. Pengumpulan semen kambing dengan menggunakan vagina buatan
2. Pemisahan plasma seminalis kambing
3. Purifikasi protein plasma seminalis kambing
4. Identifikasi protein Insulin Like Growth Factor I dengan metode Native- PAGE
5. Isolasi protein Insulin Like Growth Factor I dengan metode elektroelusi
6. Penentuan berat molekul protein Insulin Like Growth Factor I dengan menghitung nilai RF (Retardation Factor) dari masing-masing pita
7. Penentuan kadar protein IGF \rightarrow I dengan metode Biuret
8. Karakterisasi dengan Western Blot

4.4.1 Koleksi Semen dan Purifikasi Protein

Semen ditampung dari kambing jantan peranakan etawa dengan menggunakan vagina buatan. Semen tersebut ditambah dengan Phosphat Buffer Solution (PBS) kemudian disentrifus pada suhu 5° Celcius dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit, kemudian supernatannya (plasma semen) diambil dengan mikropipet dimasukkan kedalam ependorf. Purifikasi dilakukan dengan cara menambahkan Phosphat Buffer Saline(PBS) dan Phenylmethenesulfonyl fluoride (PMSF) kemudian divortex selama 5 menit, disonikator selama 10 menit pada suhu 4° Celcius kemudian divortex lagi dan disentrifus dengan kecepatan 6000 rpm selama 10menit. Supernatannya diambil ditambah dengan etanol absolut dengan perbandingan 1:1 dan diendapkan semalam (sampai tidak bau etanol), etanolnya dibuang kemudian peletnya ditambah dengan Tris Cl dengan 1-2 kali volume pellet.

4.4.2. Identifikasi Protein Insulin Like Growth Factor -I dengan metode Native - PAGE

Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (stacking gel) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (separating gel). Separating gel dimasukkan ke dalam plate menggunakan mikropipet, permukaan dilapisi dengan menambahkan aquades dan dibiarkan 10-30 menit hingga terbentuk gel. Selanjutnya stacking gel dituangkan di atas separating gel yang telah memadat, setelah itu dipasang sisir untuk membentuk sumuran dan didiamkan selama 30 menit. Setelah terbentuk gel, sisir diangkat dengan hati-hati. Plate dipasang pada alat elektroforesis dan berikutnya buffer PBS dituangkan pada chamber elektroforesis.

Limabelas μ l sampel ditambah 15 μ l Non RSB (Non Reducing Sample Buffer). dimasukkan ke dalam ependorf, kemudian dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 derajat Celcius selama 3 menit. Setelah dingin sampel diambil sebanyak 15 μ l dimasukkan dalam tiap-tiap sumur. Protein standart diperlakukan sama dengan sampel. Setelah itu anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan dengan reservoir atas. Power supply dihidupkan dengan arus listrik sebesar 30 mA, 130 V selama 1 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian \pm 0,05 cm dari batas bawah plate gel. Plate dibuka dan gel diambil untuk dilakukan pewarnaan dan pencucian gel.

Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel dalam larutan staining Coomassie Blue R-250 selama 30-60 menit. Kemudian dilakukan penghilangan warna dengan merendam gel dalam larutan destaining dan digoyang secara otomatis sampai gel menjadi jernih dan hasil elektroforesis difoto atau discan.

4.4.3. Isolasi protein Insulin Like Growth Factor -I dengan metode Elektroelusi

Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan band pada gel Native-PAGE ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap dijaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian atas dan bawah selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat elektroforesis horizontal (Bio-Rad). Alat elektroforesis Bio-Rad diisi dengan E buffer sebanyak 500 ml dalam posisi buffer melebihi kawat. Running elektroelusi dilakukan pada kondisi 150 Volt, 40 mA selama 2 jam. Cairan hasil elektroelusi ditampung dalam tabung Eppendorf, disimpan pada suhu -70°C Celcius, siap dipakai untuk penelitian berikutnya.

4.4.4. Penentuan berat molekul protein plasma seminalis kambing

Penentuan berat molekul (massa molekul relatif) masing-masing konstituen dilakukan dengan menghitung nilai R_f (Retardation factor) dari masing-masing pita secara manual Native PAGE Molecular Weight Standardt dimana :

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga R_f sebagai sumbu x dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu y. Berat molekul ditentukan dengan diinterpolasikan pada kurva standar.

4.4.5. Penentuan kadar protein IGF-I dengan metode biuret

Penentuan protein menggunakan metode biuret diawali dengan pembuatan kurva standar Bovine Serum Albumin (BSA) . Preparasi pengukuran protein dari sampel dilakukan sebagai berikut :

Kandungan protein IGF-I ditentukan dengan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar BSA. Diambil 0,5 ml sampel IGF-I ditambah 1 ml larutan standar BSA 5000 ppm dan 4 ml reagen biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV – Vis pada λ maksimum yaitu 550 nm. Sebagai blanko dipipet 1,5 ml air dan ditambah 4 ml reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya dan diulangi 3 kali. Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA.

4.4.6. Karakterisasi protein Insulin Like Growth Factor I dengan metode Western Blot.

Western Blot dilakukan pada alat pentransfer sistem semi kering atau basah. Transfer dilakukan pada membran PVDF (polyviniliden difluorida) atau nitroselulose (NC) Tahapan kerja western blot adalah sbb : preparasi protein antigen, penyiapan Native-PAGE penyiapan membran dan transfer protein pada membran, inkubasi dengan antibodi (primer dan sekunder). Gel hasil elektroforesis dicuci dengan aquades dan direndam dalam buffer blotting. Membran NC atau PV dipotong dan dibasahi dengan PBS selama 10 menit pada suhu kamar. Sebelum dilakukan proses blotting, membran

direndam terlebih dahulu. Black side (Spon) dan kertas saring direndam dalam blotting buffer dan disusun dengan urutan dari atas kebawah sbb: spon- kertas saring 6 lembar – gel – membran NC – kertas saring 9 lembar – spon (Red side).Selanjutnya transfer dilakukan semalam pada 25 Volt pada suhu 4 ° C.

Membran di-blocking dalam PBS-T skim milk 5% selama 1 jam sambil digoyang. Kemudian dicuci 3 X 5 menit dengan PBS-T dan diinkubasi dengan antibody primer yang telah diencerkan dalam PBS-T Skim 5% (1 : 200). Semalam pada suhu 4° C dan dicuci lagi 3 X 5 menit dengan TBS. Selanjutnya diinkubasi dengan antibodi sekunder AP (Conjugated (1 : 2500 dalam TBS) selama 1 jam pada suhu ruang. Dicuci dengan PBS-T selama 4 X 5 menit, ditambah substrat Western Blott dalam ruang gelap ke membran selama semalam atau sampai terlihat warna band, dicuci dalam akuades.

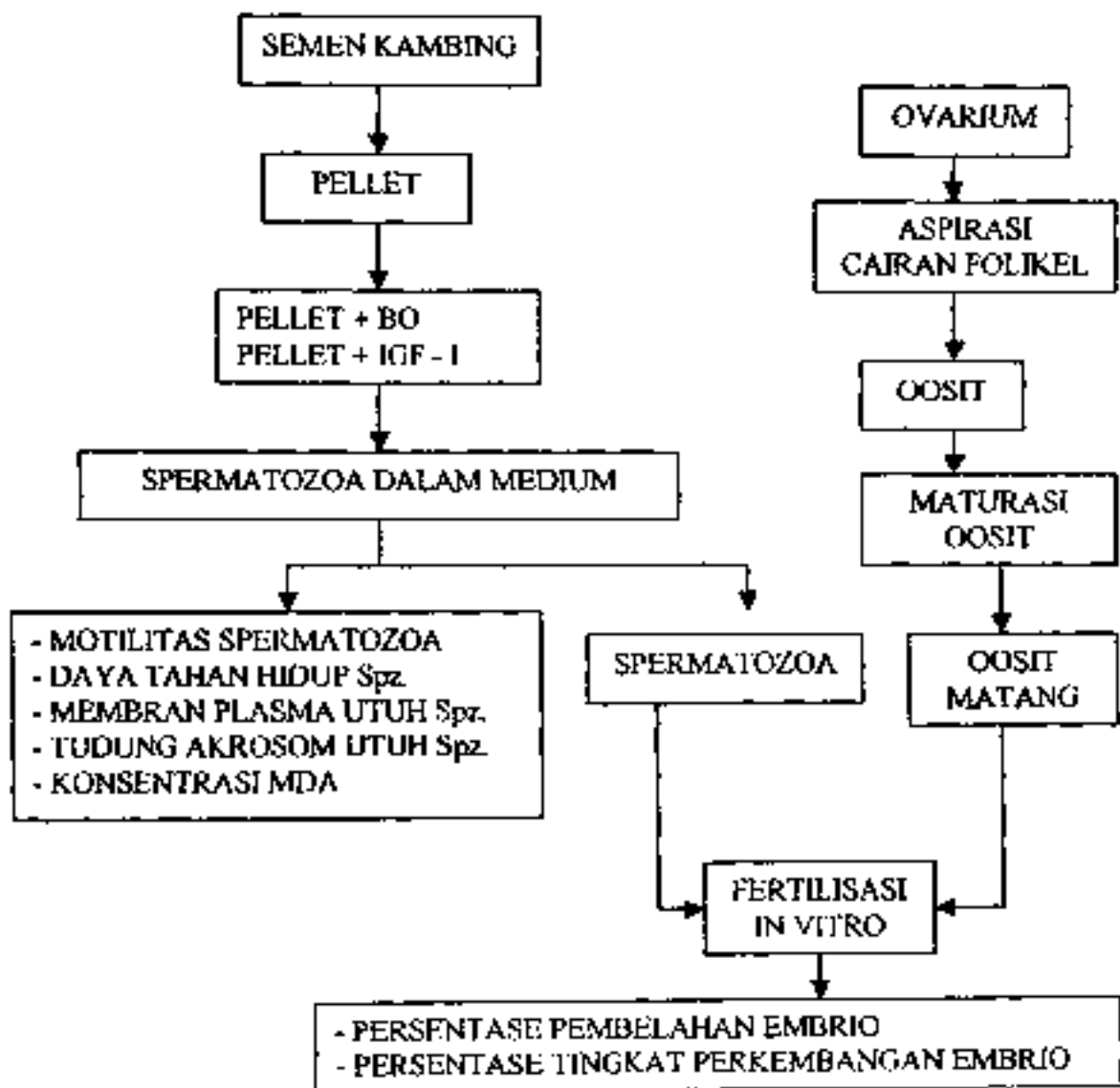
4.5.Tahapan penelitian pada penelitian tahap II.

Uji kualitas spermatozoa kambing pada media yang telah ditambah dengan isolat protein Insulin Like Growth Factor -I (IGF -I) plasma seminalis , dilakukan pemeriksaan motilitas, daya tahan hidup, membran plasma utuh , tudung akrosom dan konsentrasi malondialdehid (MDA). Selanjutnya dilakukan fertilisasi in vitro untuk mengamati persentase pembelahan dan tingkat perkembangan embrio.

4.5.1. Rancangan penelitian

Penelitian tahap II termasuk penelitian eksperimental laboratorik. Masing-masing ulangan terdiri dari 8 ulangan.

4.5.2. Kerangka Operasional Penelitian Tahap II : Penambahan Insulin Like Growth Factor I plasma seminalis kambing terhadap kualitas spermatozoa



4.5.3. Variabel Penelitian :

Variabel bebas : dosis IGF -1

Variabel tergantung : motilitas, daya tahan hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom, kadar malondialdehid (MDA) persentase pembelahan, tingkat perkembangan embrio.

Variable kendali : umur kambing, pakan, pemeliharaan, semen , ovarium, sentrifugasi, medium BO

4.5.4. Definisi Operasional Penelitian :

1. Motilitas spermatozoa : pergerakan spermatozoa dengan arah kedepan
2. Daya tahan hidup spermatozoa : adanya warna jernih pada kepala spermatozoa pada waktu pemeriksaan dengan eosin negrosin.
3. Membran plasma utuh (MPU) : adanya pembengkakan pada kepala dan adanya ekor yang melingkar yang diuji dengan teknik Hypoosmotik Swelling Test (HOST).
4. Keutuhan tudung akrosom : spermatozoa yang mempunyai tudung akrosom utuh ditandai dengan tudung akrosom berwarna hitam dengan pewarnaan formalin.
5. Malondialdehid (MDA) : golongan aldehid yang dihasilkan akibat peroksidasi (asam lemak poli tak jenuh)
6. Persentase pembelahan embrio : jumlah embrio yang membelah setelah oosit dibuahi in vitro oleh spermatozoa yang telah mengalami kapasitasasi dalam media pembuahan
- 7 Tingkat perkembangan embrio : jumlah embrio dalam tingkatan yang berbeda (2,4,8 dan 16 sel) dari keseluruhan jumlah embrio yang membelah.

4.5.5. Bahan dan alat Penelitian :

4.5.5.1. Bahan penelitian :

Isolat protein [GF-I] plasma seminalis yang sudah murni, semen kambing yang mempunyai libido tinggi dan berumur 3-5 tahun, eosin negrosin , thiobarbiturat dan ovarium kambing. Media untuk pencucian adalah Bracket and Oliphant (BO) Larutan hiposmotik 0,032M (7,35g Natrium sitrat 2 H₂O, 13,52 g fruktosa yang dilarutkan ke dalam 1 liter aquades). Sedang untuk pemeriksaan tudung akrosom bahan yang digunakan adalah Na Cl 0,9 g, aquabidest, formalin, minyak emersi. Untuk media pencuci oosit dipakai Oocyte Washing Solution (OWS), sedangkan untuk proses pematangan oosit dipergunakan TCM+FCS+ Serum sapi birahi, bahan lain yang digunakan untuk proses pembuahan in vitro adalah minyak mineral/ minyak parafin, Na Cl fisiologis, aquadest, alkohol 70%, Na Cl 3%, kapas, kertas tissue, vaselin , penisilin-streptomisin.

4.5.5.2. Alat-alat Penelitian :

Vagina buatan dan tabung skala untuk menampung semen, Haemositometer Thoma, termometer, pH meter. Inkubator CO₂ (Compact CO₂ series 500) yang dilengkapi dengan pengatur suhu dan kelembaban, lemari es, mikroskop stereo disetung (meiji), Mikroskop Compount dan Mikroskop Inverte (Meiji) bilik steril, meja penghangat-magnetic stirer, beaker glass, penangas air pengaduk magnet, timbangan mikro, pipet mikro (eppendorf), tabung reaksi , gelas beker, gelas erlenmeyer, cawan petri, millipore filter, pipet pasteur, alat suntik 1,25 ml, 10 ml dan 20 ml. Jarum suntik ukuran 18 Gauge

4.5.6. Prosedur penelitian dan Pengumpulan Data

4.5.6.1. Pengumpulan sampel

Sebelum dilakukan pencucian dan kapasitasi, spermatozoa dipersiapkan terlebih dahulu dengan memisahkan spermatozoa dari plasma semen. Pemisahan ini dapat dilakukan melalui sistem pencucian. Pada penelitian ini digunakan semen segar dari 3 ekor kambing yang mempunyai libido tinggi dengan menggunakan vagina buatan kemudian dilakukan pemeriksaan kuantitas dan kualitas semen yang meliputi pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis.

4.5.6.2. Pencucian spermatozoa

Pada semen yang kualitasnya baik diambil sebanyak 0,25 ml dimasukkan dalam tabung sentrifuse yang di dalamnya berisi media Bracket Oliphan (BO) 0,5 ml (1:2) kemudian disentrifus 1800 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, ambil 2 tabung, tabung I mengandung 3×10^6 spermatozoa dan ditambah dengan medium BO. Tabung II diisi dengan spermatozoa sebanyak 3×10^6 dan ditambah protein IGF-I sebanyak 10 μ L. Tabung I dan II diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Kemudian dilakukan pemeriksaan motilitas, daya tahan hidup, membran plasma utuh, keutuhan tudung akrosom dan kadar malondialdhid.

4.5.6.3. Pemeriksaan Motilitas Spermatozoa

Sebanyak 10 μ l spermatozoa ditetaskan pada gelas obyek yang terdapat lekukan ditengahnya, kemudian ditutup dengan gelas penutup dan diamati motilitas spermatozoa dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 x. Motilitas spermatozoa ditentukan dengan menghitung pergerakan spermatozoa motil dan tidak motil sampai

sebanyak 100 spermatozoa. Motilitas spermatozoa dibagi menjadi 4 yaitu : bergerak maju kedepan, bergerak mundur , bergerak berputar atau ditempat dan tidak bergerak.

4.5.6.4. Pemeriksaan Hidup Mati Spermatozoa

Sebanyak 10 μ l spermatozoa ditetaskan pada gelas obyek ditambah eosin negrosin dicampur homogen kemudian dibuat preparat ulas, kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400 x. Spermatozoa hidup ditentukan bila pada pengamatan kepala spermatozoa berwarna jernih.

4.5.6.5. Pemeriksaan Membran Plasma Utuh Spermatozoa

Dilakukan dengan uji Hypo Osmotik Swelling Test (HOST) menggunakan larutan sitrat dan fruktosa. Sampel sebanyak 0,1 ml (100 μ l) dimasukkan ke dalam vial eppendorf yang telah diisi dengan larutan sitrat fruktosa sebanyak 1 ml. Kemudian di inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya dibuat preparat ulas dengan pewarnaan eosin (1:1). Evaluasi 100 spermatozoa dibawah mikroskop dengan pembesaran 400 x. Penilaian dilakukan dengan menghitung proporsi spermatozoa dengan membran plasma utuh ditandai dengan ekor melingkar, sedangkan spermatozoa yang memiliki membran plasma rusak ditandai oleh ekor yang lurus.

4.5.6.6. Pemeriksaan Keutuhan Tudung Akrosom

Pemeriksaan keutuhan tudung akrosom dilakukan dengan pembuahan larutan Na Cl fisiologis yaitu 0,9 g Na Cl dilarutkan dengan aquabidestilata sampai volume 100 ml. Kemudian 1 ml formalin ditambahkan ke dalam 99 ml larutan Na Cl fisiologis dan

dikocok sampai homogen. Satu bagian spermatozoa dicampur dengan tiga bagian larutan diatas sampai homogen, didiamkan sekitar 3 menit. Selanjutnya preparat dibuat dengan cara meneteskan satu tetes larutan diatas pada obyek gelas dan tutup dengan gelas penutup. Dengan menggunakan kertas tissue preparat ditekan pelan dan kelebihan cairan dikeringkan.

Seratus spermatozoa dievaluasi dibawah mikroskop fase kontras dengan pembesaran 1000 x menggunakan minyak emersi. Penilaian dilakukan dengan cara menghitung proporsi spermatozoa dengan tudung akrosom utuh dalam 100 spermatozoa. Spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh ditandai oleh keberadaan tudung akrosom yang berwarna hitam

4.5.6.7. Pemeriksaan kadar malondialdehyde (MDA) spermatozoa

Pemeriksaan kadar MDA pada penelitian ini dilakukan menggunakan modifikasi metode test Thiobarbiturat Acid (TBA) yang dikembangkan oleh Alvarez and Storey (1995). Sebanyak 100 μ l suspensi spermatozoa dari kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dipisahkan dari proteinnya dengan cara penambahan 100 μ l asam trikloroasetat 20 % dan vortex selama 30 detik, kemudian tambahkan dengan 250 μ l HCL 1N, 100 μ l natrium thiobarbiturat 1 % dan aquadest sampai volume akhir menjadi 1 ml (450 μ l), selanjutnya dipanaskan dalam water bath pada suhu 100°C selama 20 menit. Kemudian sentrifugasi pada kecepatan 3500 rpm selama 10 menit. Sebanyak 800 μ l supernatannya dimasukkan dalam tabung lain dan tambahkan dengan aquadest sampai volume akhir 2,0 ml. Serapan warnanya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 529 nm. Penilaian kadar MDA dilakukan dengan cara

mengkonversikan nilai hasil pengukuran absorbansi dengan nilai kurva baku standar MDA murni dalam berbagai konsentrasi. Selanjutnya nilai hasil perkalian pada kurva standar baku, selanjutnya nilai yang dapat dikalikan lagi dengan factor pengenceran yang digunakan. Kadar MDA diukur berdasarkan jumlah μg atau nmol MDA pada setiap ml suspensi spermatozoa atau jumlah konsentrasi spermatozoa per ml.

4.7.6.8. Koleksi oosit dan pematangan oosit *In Vitro*

Ovarium kambing yang digunakan diperoleh dari RPH (Rumah Potong Hewan) dan dibawa ke laboratorium dalam larutan Na Cl fisiologis 0,9 % yang telah ditambahkan penisilin dan streptomisin pada suhu $30-35^{\circ}\text{C}$ dengan menggunakan termos. Di Laboratorium, ovarium yang diperoleh dimasukkan dalam gelas beker yang berisi Na Cl fisiologis dan ditempatkan dalam penangas air dengan suhu tetap 37°C . Ovarium diambil satu persatu dengan pinset, dikeringkan permukaannya dengan kertas tisuue steril untuk perlakuan selanjutnya.

Oosit diambil dengan cara aspirasi cairan folikel ovarium yang ukuran diameternya 3-5 mm, menggunakan alat suntik yang steril dan jarum suntik ukuran 18 Gauge.cairan folikel kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi secara hati-hati supaya sel –sel kumulus tidak rusak dan disimpan dalam penangas air dengan suhu 37°C , ditunggu 10 menit sampai oosit mengendap. Kemudian cairan bagian bawah dievaluasi dengan menempatkan pada cawan petri dibawah mikroskop sterio dengan pembesaran 100 x. Hanya oosit yang mempunyai kumulus lengkap digunakan, kemudian dicuci sebanyak 2 kali dengan larutan OWS dan satu kali dengan media pematangan.

Pematangan digunakan media Tissue Culture yang terdiri dari TCM 199 yang ditambahkan dengan 1% Foetal Calf Serum (FCS), 100 μl pyruvat, 25 μg gentamisin dan

ditambahkan serum sapi berahi 10%. Oosit dimatangkan pada media dalam bentuk tetes (50 μ l/tetes). Kemudian tetes tersebut ditutup dengan minyak parafin dan diequilibrasi di dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C dengan kelembaban 95% paling sedikit 2 jam sebelum digunakan untuk pematangan oosit. Setelah pencucian dengan media pematangan, 5-10 oosit yang berkumulus lengkap ditempatkan dalam tetes fertilisasi media pematangan kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ 5% yang sama untuk equilibrasi.

4.7.6.9. Pengamatan Pembuahan In Vitro

Media kapasitasi spermatozoa juga merupakan media pembuahan dan perkembangan embrio. Oosit yang telah dimatangkan selama 24 jam dalam media pematangan dihilangkan sel kumulusnya dengan mencuci 3 kali dalam media OWS dan satu kali pada media EBSS. Oosit kemudian dipindahkan ke dalam tetes kecil masing-masing media pembuahan terdiri dari IGF-I dan BO saja. Setiap tetes media berisi 5-10 oosit dan diinkubasi dalam inkubator dengan CO₂ 5% dengan kelembaban 95% pada suhu 38,5°C. Pengamatan pembelahan (Cleavage) embrio dilakukan pada hari ke 2 (48 jam) setelah pembuahan. Data yang dikumpulkan dalam penelitian ini adalah jumlah embrio yang berhasil membelah setelah dibuahkan dalam media pembuahan selama 48 jam dalam inkubator CO₂ 5%

$$\text{Persentase pembelahan} = \frac{\text{Jumlah embrio yang membelah}}{\text{Jumlah oosit yang dipakai fertilisasi}} \times 100\%$$

Sedangkan persentase tingkat perkembangan embrio adalah jumlah embrio dalam tingkatan yang berbeda (2, 4, 8 dan 16 sel) dari keseluruhan jumlah embrio dalam tingkatan yang berbeda (2, 4, 8 dan 16 sel) dari keseluruhan jumlah embrio yang positif membelah.

7.3. Analisis Data

Data yang diperoleh dicatat dan ditabulasikan kemudian diuji dengan T Test (Santoso dan Fandy, 2001).

BAB 5

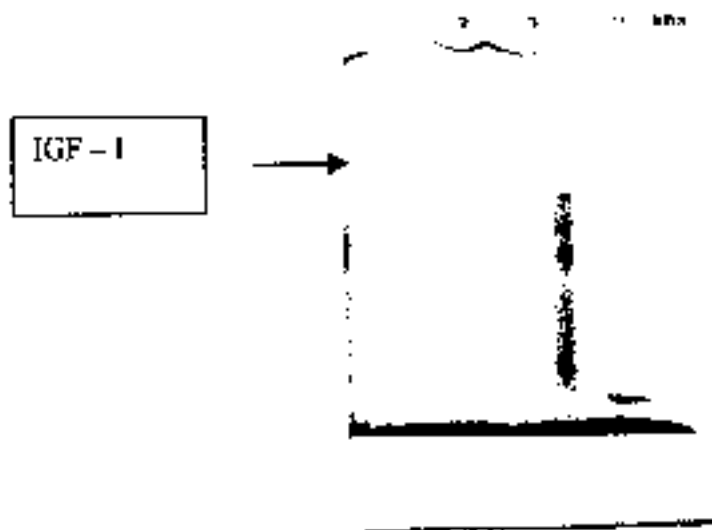
HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Penelitian Tahap 1: Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Insulin Like Growth Factor I Plasma Seminalis Kambing.

5.1.1. Identifikasi Insulin Like Growth Factor -I dengan Native-PAGE 12%

Identifikasi konstituen-konstituen protein plasma seminalis kambing dilakukan dengan Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Native-PAGE) konsentrasi 12 % dalam elektroforesis set mini protein gel.

Plasma seminalis kambing dalam proses elektroforesis dengan Native-PAGE menghasilkan 7 band. Berdasarkan urutan massa molekul relatif (Mr) nya selanjutnya ketujuh band tersebut berturut-turut adalah band pertama (Mr 150kDa), band kedua (Mr 103 kDa), band ketiga (Mr 73 kDa), band keempat (Mr 53), band kelima (Mr 35 kDa), band keenam (Mr 14 kDa) dan band ketujuh (Mr 11 kDa) (Gambar 1)



Gambar 1. Gel hasil Analisis dengan Native - PAGE 12 % pada plasma seminalis kambing (M: marker, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 ; sampel IGF - I).

5.1.2. Hasil Karakterisasi Insulin Like Growth Factor - I dengan Western Blott



Gambar 2. Hasil Western Blott

Metode immunoblotting merupakan metode yang digunakan untuk membuktikan pita protein IGF - I yang muncul saat melakukan running native PAGE.

5.1.3. Hasil penghitungan konsentrasi Insulin Like Growth Factor I dengan metode Biret.

Hasil penghitungan dari tiga sampel isolat Insulin Like Growth Factor I dengan metode biret adalah : 22.000, 42.000 40.000 ng/ μ l dengan rata-rata 34666, 67 ng/ μ l.

5.2. Penelitian Tahap II

5.2.1. Pemeriksaan Makroskopis dan Mikroskopis Semen Kambing Untuk Perlakuan.

Hasil pemeriksaan makroskopis semen kambing yang ditampung dari pejantan kambing yang akan dipakai untuk perlakuan adalah sebagai berikut : volume hasil penampungan semen dalam penelitian ini berkisar 1,20 sampai 1,90 ml dengan rata-rata 1,54 ml. Dalam pemeriksaan warna , bau,pH dan konsistensi tidak terdapat penyimpangan. Warna semen adalah normal yaitu berwarna krem. Bau semen khas untuk kambing dan tidak berbau busuk atau anyir. pH air mani berkisar 6,4 sampai 6,6 dengan rata-rata 6,48. Konsistensi semen yang diperoleh adalah kental berarti semen tersebut konsentrasinya tinggi.

Hasil pemeriksaan mikroskopis semen kambing yang ditampung dari pejantan kambing yang akan dipakai untuk perlakuan adalah sebagai berikut : Konsentrasi semen yang didapat berkisar antara 2350 sampai 2550 juta/ml dengan rata-rata 2410 juta/ml. Gerakan massa spermatozoa sangat baik yaitu menunjukkan gerakan yang besar dan banyak serta gerakan individu spermatozoa semua sample adalah progresif (P), ini berarti spermatozoa bergerak aktif maju ke depan. Persentase spermatozoa yang hidup berkisar 88-92 % dengan rata-rata 90,8%.

Bila hasilnya memuaskan, kemudian dilakukan manipulasi *in vitro*.

5.2.2. Persentase motilitas, hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh, konsentrasi malondialdehid spermatozoa setelah perlakuan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata persentase motilitas, hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh, konsentrasi malondialdehid spermatozoa

Parameter	P1 (BO)	P2 (IGF – I)
Motilitas (%)	$31,88 \pm 3,18^b$	$76,88 \pm 2,95^a$
Hidup (%)	$35,88 \pm 2,90^b$	$80,13 \pm 2,30^a$
MPU (%)	$33,63 \pm 2,83^b$	$81 \pm 2,56^a$
TAU (%)	$33 \pm 3,66^b$	$80,25 \pm 3,01^a$
MDA (nmol / ml)	$35,19 \pm 2,86^a$	$19,17 \pm 2,69^b$

Keterangan :

P1 : Dalam medium Bracket and Oliphan't (BO)

P2 : Dalam medium Insulin Like Growth Factor I (IGF-I)

MPU: Membran Plasma Utuh

TAU: Tudung Akrosom Utuh

MDA: Malondialdehid

Dari tabel 1 dapat dibaca bahwa persentase motilitas, hidup, membran plasma utuh dan tudung akrosom utuh yang lebih tinggi dari dua perlakuan medium tersebut adalah perlakuan 2 (pada medium Insulin Like Growth Factor I) (Gambar 1-3). Dari tabel 1 dapat juga dibaca bahwa konsentrasi malondialdehid (MDA) pada perlakuan 2 (pada medium Insulin Like Growth Factor – I) konsentrasinya lebih rendah.

Berdasarkan analisis statistik dengan uji T Test (Lampiran 1-5) menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) pada motilitas, hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh dan konsentrasi malondialdehid. Hal tersebut karena Insulin Like Growth Factor -I (IGF-I) mempunyai reseptor pada membran plasma spermatozoa sehingga terjadi ikatan antara spermatozoa dengan ligananya. Ikatan tersebut akan mengaktifkan

molekul membran yang kemudian mengaktifkan molekul sitosol spermatozoa dengan bantuan protein pengangkut yang ada pada membran yang selanjutnya akan mempunyai efek pada motilitas spermatozoa. Insulin Like Growth Factor -I (IGF -I) mempunyai peran sebagai antioksidan dengan mekanisme pemutus rantai sehingga reaksi rantai yang ditimbulkan akibat Reaktif Oxygen Species (ROS) pada spermatozoa hasil sentrifugasi dapat diredam. Akibat peran IGF -I tersebut membran plasma maupun tudung akrosom spermatozoa tidak mengalami kerusakan sehingga transport molekul yang melalui membran berjalan dengan normal, produksi ATP (Adenosin Tri Phosphat) normal yang akhirnya persentase spermatozoa yang hidup cukup banyak. Insulin Like Growth Factor - I yang berperan sebagai antioksidan akhirnya menurunkan konsentrasi malondialdehid (MDA) yang merupakan hasil akhir dari reaksi berantai dari asam lemak poli tak jenuh.

5. 2. 3. Persentase pembelahan embrio dan tingkat pembelahan embrio

5.2.3.1. Persentase embrio yang membelah pada spermatozoa hasil perlakuan

Tabel 2. Persentase embrio yang membelah pada spermatozoa hasil perlakuan

Perlakuan	Pembelahan Embrio
P1 (BO)	46,97 ± 4,43 ^b
P2 (IGF - I)	60,87 ± 6,62 ^a

Keterangan :

BO : Bracket and Oliphant

IGF -I : Insulin Like Growth Factor - I

Dari tabel 2 dapat dibaca bahwa persentase embrio yang membelah setelah pembuahan yang paling tinggi pada kelompok 2 yaitu pada medium IGF-I (Gambar 4-5) Analisis statistik dengan uji T Test (Lampiran 6-10) terhadap pembelahan embrio memperlihatkan adanya perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara kelompok medium Brackets and Oliphan't dan medium protein IGF -I

5.2.3.2. Persentase perkembangan embrio 2, 4, 8 dan 16 sel dengan spermatozoon pada perlakuan BO dan IGF-I

Tabel 3. Persentase perkembangan embrio 2, 4, 8 dan 16 sel dengan spermatozoon pada perlakuan BO dan IGF -I

Perlakuan	Tingkat Perkembangan Embrio (%)			
	2 Sel	4 Sel	8 Sel	16 Sel
P1 (BO)	57,08 \pm 6,80 ^a	26,56 \pm 14,08 ^a	8,74 \pm 9,83 ^b	7,75 \pm 9,13 ^b
P2 (IGF - I)	24,73 \pm 12,87 ^b	25,38 \pm 16,62 ^a	23,78 \pm 14,06 ^a	20,20 \pm 7,04 ^a

Keterangan :

BO = Bracket and Oliphan't

IGF - I = Insulin Like Growth Factor I

Dari tabel 3 dapat dibaca bahwa persentase perkembangan embrio 2 , 8 dan 16 sel pada kelompok 2 (medium IGF -I) lebih tinggi. Analisis statistik dengan uji T Test pada perkembangan embrio 2, 8, 16 sel memperlihatkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$) antara kelompok medium Bracket and Oliphan't dan medium protein IGF-I. Sedangkan persentase perkembangan embrio 4 sel dengan uji T Test tidak terdapat perbedaan ($P > 0,05$).

Menurut Hafez (2000) , keberhasilan pelaksanaan pembuahan *in vitro* selain dipengaruhi oleh lingkungan dan kematangan oosit juga dipengaruhi oleh tingkat motilitas spermatozoa yang digunakan pada proses pembuahan. Selain motilitas spermatozoa , dua proses yang sangat fundamental untuk terjadinya fertilisasi yaitu kapasitas dan reaksi akrosom. Banyak sekali factor yang mempengaruhi motilitas spermatozoa baik yang bersifat endogen maupun eksogen . factor endogen meliputi keadaan individu spermatozoa yang erat kaitannya dengan umur spermatozoa, tingkat maturasi spermatozoa meliputi morfologi, faal dan sifat-sifat biokimia, juga factor-faktor yang menyangkut pengadaan energi misalnya transport melalui membran sel spermatozoa. Protein Insulin Like Growth Factor -I plasma seminalis kambing mampu meningkatkan persentase membran plasma utuh maupun tudung akrosom utuh, sehingga meningkatkan spermatozoa yang hidup dan motilitas spermatozoa. IGF-I juga mampu meningkatkan persentase spermatozoa yang mengalami reaksi kapasitas dengan masa inkubasi selama 30 menit (Susilowati, 2006) . Kapasitas merupakan perubahan selaput pada kepala spermatozoa khususnya pada bagian akrosom. Akibat proses kapasitas, metabolisme tubuh spermatozoa meningkat sehingga ekor spermatozoa akan lebih aktif bergerak dan menyebabkanketahanan gerak maju bertambah (Hardjopranto, 1987).

Dari hasil diatas menunjukkan bahwa penambahan protein IGF -I pada medium pencucian spermatozoa sangat efektif untuk meningkatkan fertilisasi pada kambing, dari hasil tersebut juga menunjukkan adanya korelasi yang positif antara persentase motilitas dan persentase pembelahan embrio. Oosit matang yang mencapai tahap metafase II mempunyai pertahanan pada zona pelusida dan selaput vitelin yang lebih kuat, sehingga

hanya spermatozoa yang motilitasnya tinggi saja yang dapat menembus pertahanan tersebut (Hafez, 2000).

Pada tingkat perkembangan embrio 4 sel pada perlakuan 1 (medium Dracket and Oliphan't) dan pada perlakuan 2 (medium protein Insulin Like Growth Factor -I) tidak terdapat perbedaan . Hal ini kemungkinan pada perlakuan 1 yaitu pada tingkat perkembangan embrio 4 sel tidak mampu meneruskan pembelahanannya sampai tahap berikutnya sedangkan pada perlakuan 2 dapat meneruskan perkembangannya. Insulin Like Growth Factor I melindungi kondisi in vitro seperti peroksidasi lemak-lemak membran yaitu sebagai antioksidan yang berhubungan dengan sensitivitas dari embrio awal (embrio yang baru membelah) terhadap radikal bebas yang merusak, yang mungkin menghambat atau bahkan mencegah pembelahan embrio.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan :

- a. Bahwa Insulin Like Growth Factor-I plasma seminalis kambing dapat digunakan sebagai medium pencucian spermatozoa dengan indikator dapat meningkatkan persentase motilitas, hidup, membran plasma utuh, ludung akrosom utuh serta menurunkan konsentrasi malondialdehid (MDA).
- b. Medium Insulin Like Growth Factor I dapat meningkatkan angka pembelahan embrio (8 sel dan 16 sel) pada proses Fertilisasi In Vitro. .

6.2. Saran

Saran dari penelitian ini adalah perlu diteliti tentang lamanya inkubasi setelah penambahan Insulin Like Growth Factor I sehingga dihasilkan proses kapabilitas yang lebih cepat serta dapat ditambahkan pada proses pembuatan semen beku.

DAFTAR PUSTAKA




- Agarwal, A.; Ikemoto and K.R. Loughlin, 1994. Relationship of Sperm Parameter to level of Reactive Oxygen Species in semen Specimens. *J. Urol.* 152: 107-110.
- Agarwal, A.; R.A. Saleh and M.A. Bedalwy, 2003. Role of Reactive Oxygen Species in the Pathophysiology of Human Reproduction. *Fertility and Sterility*, 79: 829-843.
- Aitken, R.J.; Clarkson, J.S and Fishert, 1990. Generation of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxydation and Human sperm Function. *Biology Reprod.* 40 : 183-197.
- Aitken, R.J., 1994. A Free Radical Theory of Male Infertility. *Reprod Fertil. Dev.* 6 : 19-24.
- Alvarez, J.G and B.T. Storey, 1995. Differential incorporation of Fatty acid into and peroxidative loss of fatty acid from phospholipid of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 334-345.
- Anastasia, D.; J. Mistry; R.G. Krishna and J. Khosravi, 2000. Immunoassay of Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3) New Means to Quantifying IGFBP3 Proteolysis. *J. Endocrin and Metabolis.* 85 : 2327-2330.
- Baldi, E., Michaelal, Lorella, B., Monica, M and Gianni, F.; 2000. Intracellular Event And Signaling Pathways Involved In Sperm Acquisition of Fertilizing Capacity And Acrosom Reaction, *Frontier in Bioscience* 5 .p. 110-123.
- Bambang, P., 2003. Hambatan Hesperidin Terhadap Fungsi Spermatozoa. Disertasi. Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Barreca, A.; Ponzani, P.; Arvigo, M.; Giordano G; Minuto, F., 1995. Effect of The Acid Labile Subunit on the Binding of Insulin-Like Growth Factor (IGF) Binding Protein 3 to (125 I) IGF-I. *J. Clin. Endocrinol Metab* 80(4): 1318-1324.
- Baxter, R.C., 1990. Circulating Levels and Molecular Distribution of The Acid labile (Alpha) Subunit of The High Molecular Weight Insulin Like Growth Factor Binding Protein Complex. *Australia. J. Clin. Endocrinol. metab.* 70(5).
- Beatriz, B.; R. Perez-Pe, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Munoz Blanco and J.A. Cebrian-Perez, 2000. Seminal Plasma Proteins Revert the Cold Shock damage on Ran Sperm Membrane. *Biology Reproduction*. 63: 1531-1537.
- Birkenmeier, G.; Glander, H.J., Kratzsch and Weisbrich, C., 1996. Insulin Like Growth Factor I and Alpha-2 Macroglobulin in Seminal Plasma. *Human Reprod.* 11(11): 2454-2460.

- Clemmons,D.R and Jones, J.L, 1995. Insulin Like Growth Factor and Their Binding Protein Biological Action. *Endocrinology. Rev.* 16 : 3-34.
- Curry, M.R and Watson, P.F, 1995. Sperm Structure and Function in Gamete the Spermatozoon. *Cambridge Reviews in Human Reproduction*. Ed. J.G. Gruzinskas & J.L Yovich, Cambridge University Press
- Dai,J and R.C. Baxter , 1992. Molecular Cloning of The Rat Insuline Like Growth factor Binding Protein Complex. *Australia J.Biochem. Biophys.ResCommun* 188 (1).
- Darnell, J.; H. Lodish and D Baltimore, 1990. *Moleculer Cell Biology*. Second Edition. Sci.Am.Books.pp :491-527.
- Dasrul, 2005. Peran Senyawa Oksigen Reaktif Dalam Mekanisme Kerusakan Integritas Membran Spermatozoa Kerbau Lumpur Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Ding,D.C.S.M; L.Y Liou;J.Y Huang and G.J Wu. 2000. Effect of Four methods of sperm preparation on motion characteristics and nitric oxide concentrationin laboratory prepared oligospermia. *J. Zhonghus Taipeh* (11): 822-827.
- Djojosoebagio, S, 1991. DNA Rekombinan, Hewan Transgenik dan Keamanan biologik. Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat, Institut Pertanian Bogor.
- Donald,M.Henricks; J,Andrew, Knuba; R,Brett, Lackey; R,William,, Boone and Sandra,L,Gray, 1998. Identification of Insulin Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa : Influence on Sperm Motility.
- Dorota,S and M,Kurpisz, 2004. Reactive Oxygen Species and Sperm Cells. *Reprod.Biol and Endocrinology*.2 :12.
- Dralonis,E.Z; D.F.Katz.; J.W,Overstreet , 1989. Factor Regulating Mammalian Sperm Migration Through the Female Reproduction Tract and Oocyte Vestments. *Gamete Res.*22 :443-469.
- Evans, G and M.W.C.Maxwell, 1988. *Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat*. Butherworths, Sydney.
- Fitri,T.A, 2002. Pengaruh Kecepatan Dan Sentrifugasi Terhadap Keutuhan Membran Plasma dan Tudung Akrosom Spermatozoa Sapi Madura. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.
- Fraga,C.G; P.A,Motchnik, A.J,Wytobek. and M.K,Shigenaga, 1996. Smoking and Low Antioxydant Levels Increase Oxidation Damageto Sperm DNA. *Mutat. Res.* 351 :199-203.

- Frandsen, R.D, 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi Ke empat. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Gill,R ; C,Verma, B,Wallach ; B,Urso ; J,Pitts ; A,Wollmer , P, De Meyts and M,Wood, 1999. Modelling of the Disulphide Swapped Isomer of Human Insulin Like Growth Factor I : Implication for Receptor Binding,Oxford. J. Prot.Eng.12(4) : 297-303.
- Gordon L, 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. University Press. Cambridge. P. 148-161.
- Griveau, J.P and D. Le Lannou, 1997. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. *Physiology and Pathology*. Int.J.Androl.20 : 60-90
- Hafez, E.S.E, 2000.*Reproduction in Farm Animals*. 7th Edition. Philadelphia.baltimore.New York London.
- Halliwell, B and J.M.C.Gutteridge, 1999. *Free Radicals in Biologyand Medicine*. Third Edition Oxford : Oxford University Press : pp: 1-35, 246-350, 664-667.
- Hardijanto dan Hardjopranjoto, 1994. *Ilmu Inseminasi Buatan*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Hardjopranjoto, S, 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Cetakan ke 1. Airlangga University Press. Surabaya. 55-80.
- Hardjopranjoto, S, 1987. *Pembuahan In Vitro and Transfer Embrio*. Pidato Pengukuhan Guru Besar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.Surabaya.
- Herdis, Maman Surachman dan Muhammad Rizal, 2006. Pengaruh Penambahan Plasma Semen Terhadap Kualitas Spermatozoa Epididimis Domba Yang Telah Dibekukan. *Media Kedokteran Hewan*. Vol 22. No 1
- Higgins,J.E and Ap.Klinbaun, 1985. *Design Methodology For Randomized Clinical Trial With an Emphasis on Contraseptive Research*. Family Health International.
- Hinting,A, 1989. *Assesment of Human Sperm Fertilizing Ability*. Tesis Submitted in fulfilment of the requirement For the Degree of Special Doctor in Reproductive medicine. Rijksuniversiteit Gent , Belgium.
- Hunter,R.H.F, 1995 *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Edisi 1. ITB. Bandung.
- ismudiono, 2000. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- Iwazaki, A and C, Gagnon, 1992. Formation of Reactive Oxygen Species in Spermatozoa of Infertile Patient. *Fertil.Steril*, 57 : 408-416.

- Juan, G.A., J.L. Lasso; L. Blasco; R.C. Nufiez; S. Heyner; P.P. Caballero and B.T. Storey, 1993. Centrifugation of Human spermatozoa induce sublethal damage, separation of Human Spermatozoa from Seminal Plasma by Dextran Swim up Procedur Without Centrifugation Extend Their Motile Lifetime. *Human Reproduction*. Vol 8. No.7.
- Kostecka, Z and J. Blanovec; 1999. Insulin Like Growth Factor Binding Protein And Their Fuctions (Minireview). *Endocrine regulations*. Vol.33. 90-94.
- Lamirande, E.H.; A. Jiang ; H. Kodana; C. Gagnon, 1997. Reactive oxygen Species and Sperm Physiology. *Rev. Reprod.* Januari, 2(1):48-54.
- Laron, Z; 2001. Insulin Like Growth Factor 1 (IGF -I): a Growth Hormon. *J. Clinical Pathol : Mol pathol*(54) : 311-316.
- Macpherson, M.L; R.C.M Simmen; F.A. Simmen; J. Hernandez; B.R. Sheerin; D.D. Varner; P. Loomis; M.E Cadario; C.D. Miller; S.P. Brinko; S Rigby and T.L. Blanchard, 2002. Insulin Like Growth factor I and Insulin Like Growth Factor Binding Protein 2 and 5 Equine Seminal Plasma : Association with Sperm Characteristics and Fertility. *Biology of Reproduction*. 67: 648-654.
- Manjunant, P; I. Therien; S. Soubeyrand; 1997. Major Protein of Bovine Seminal Plasma Modulate Sperm Capacitation by High Density Lipoprotein. *Biol Reprod*. Nov, 57(5) :1080-1088.
- Miyako, H; B. Auke Andreas, H; Eckhard, W; Jurgen, F; Roland, A and Joachim, B, 2001. Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head Morphometry in Boars (*Sus Scrofa*) : Relation to Fertility and Seminal Plasma Growth Factors. *J. Andrology*. Vol 22 (1).
- Minelli, A; M. Moroni ; C. Castellini, 2001. Isolation and Purification of the IGF-I Protein Complex From Rabbit Seminal Plasma : Effect on Sperm Motility and Viability.
- Monget, P and D. Monniaux, 1995. Growth Factor and The Control of Folliculogenesis. *J. Reproduction and Fertility supplement*. Vol. 49, 321-333.
- Monk, M. 1987. *Mammalian Development a Practical Approach*. L.R.L. Press Washington.
- Mulyono, S. 1999. *Teknik Pembibitan Kambing Dan Domba*. Edisi ke 2. Penebar Swadaya. Bogor.
- Nazarudin dan Vivian, 1991. *Petunjuk Praktik Usaha Peternakan*. Cetakan ke-3. Penerbit P.D Mahkota Jakarta.
- Noian, J.P and R.H. Hammersted, 1997. Regulation of Membran Stability and The Acrosom Reaction in Mammalian Sperm.

- Pablo,E; Visconti, D,Grace; L.Janice; Bailey, L.Pierre,L; A.Stephani, Connors; Dieyun ,P,Patricia,DC; Gregory,S.K; 1995. Capacitation of Mouse spermatozoa. Division of Reproduction Biology. Departement of Obstetrics and Gynecology.
- Park,J.E and J.K. Graham, 1992. Effects of Cryopreservation Procedures on Sperm Membranes.J. Theriogenology.38 :209-222.
- Partodihardjo, S, 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Mutiara sumber Widya. Jakarta,44-45.
- Phelp,M.J;J.Liu,J.D Benson,C.E.Willoughby; J.A Gilmore and J.K.Critser, 1999. Effect of Percoll Separation, Cryoprotective Agent and Temperatureon Plasma Membrane Permeability Characteristics of Murine Spermatozoa and Their Relevance to Cryopreservation. J. Biol.Reprod.61 : 1031-1041.
- Riadi, 2004. Perubahan Karakter Ejakulat dan Aktifitas Antioksidan pada Masa Reproduksi Kambing Kacang dan Kambing Peranakan Ettawa. Disertasi. Program Pascasarjana. Unair.
- Robert,C; Baxter, L.Janet; Martin and A.B.Virginia., 1989. High Molecular Weight Insulin Like Growth Factor Binding Protein Complex. Biological Chemistry. 264 (20): 11843-11848.
- Roser, J.F and M.F.Hess, 2001. The Effect of Age and Fertility Status on Plasma and Intratesticular insulin Like Growth Factor I Concentration in Stallion. Theriogenology..56: 723-733.
- Sarwono,B, 1993. Beternak Kambing Unggul. Penerbit R.D Pereban Swadaya. Jakarta.
- Sarwono, B, 1995. Beternak Kambing Unggul. Penerbit R.D, Penebar Swadaya Jakarta.
- Shekarriz,M; A.J. Thomas and A.Agarwal, 1995. A Method of Human Semen Centrifugation to Minimize The Iatrogenic Sperm Injuries Caused by Reactive Oxygen Species. Eur Urol.28: 31-35.
- Steel, R.G.D and J.H.Torrie, 1993. Prinsip and Prosedur Statistika. Edisi Kedua. Penerbit PT . Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.210.
- Sudjarwo, 2001. Peran Mitokondria pada Fungsi Spermatozoa. Disertasi. Pasca Sarjana Unair. Surabaya.
- Sumitro, S.B,1994. Kursus Teknik-Teknik dasar Analisa Protein dan DNA. Jurusan Biologi FMIPA. Universitas Brawijaya Malang. P:35-48
- Suryohudoyo,P,2000. Ilmu Kedokteran Molekuler. Cetakan Pertama. Jakarta.CV.Sagung Scto.

- Susilawati, T., 2000. Analisis membran spermatozoa sapi hasil filtrasi sephadexs dan sentrifugasi gradien densitas oercoli pada proses seleksi jenis kelamin. Disertasi Pascasarjana Unair Surabaya.
- Tjokronegoro, A dan S.D Mohamad, 2002. Oxidative Strees and Male Infertility Pathophysiology and Clinical Implication. Jurnal Kedokteran Yarsi 10 (1): 50-59.
- Toelihere, M.R, 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa . Bandung.
- Toelihere, M.R, 1985. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Wattermann and Desjardins, 1979. Biol Reprod (20) : 235-241 
- Wijaya, A, 1996. Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan. Forum Diagnostikum Prodia Diagnostics Education Services.

T-Test

Group Statistics

	1=P1, 2=P2	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase Mobilisasi	1	8	31.88	3.18	1.13
	2	8	76.88	2.95	1.04

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Pensepase Murina	Equal variances assumed	.088	.771	-.29338	14	.000	-.4500	1.53	-43.29	-41.71
	Equal variances not assumed			-.29338	13.920	.000	-.4500	1.53	-43.29	-41.71

Expirado 2

T-Test

Group Statistics

	Pertakuan (1=P1, 2=P2)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase Hidup	1	8	35.88	2.90	1.03
	2	8	80.13	2.30	.81

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Percentage Hindu	Equal variances assumed	.622	.443	-.33841	14	.000	-.4425	1.31	-47.05	-41.45
	Equal variances not assumed			-.33841	13.258	.000	-.4425	1.31	-47.07	-41.43

T-Test

Group Statistics

	Perlakuan (1=P1, 2=P2)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi MDA	1	8	35.1863	2.8640	1.0126
	2	8	19.1737	2.6920	.9518

Independent Samples Test

		Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
Konsentrasi MDA	Equal variance assumed	.000	.992	11.522	14	.000	16.0125	1.3897	13.0319	18.9931
	Equal variance not assumed			11.522	13.947	.000	16.0125	1.3897	13.0309	18.9941

Lampiran 4

T-Test

Group Statistics

	Perlakuan (1=P1, 2=P2)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase MPU	1	8	33.63	2.83	1.00
	2	8	81.00	2.56	.91

Independent Samples Test

		Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
Persentase MPU	Equal variance assumed	.088	.771	-35.124	14	.000	-47.38	1.35	-50.27	-44.48
	Equal variance not assumed			-35.124	13.870	.000	-47.38	1.35	-50.27	-44.48

T-Test

Group Statistics

Perlakuan (1=P1, 2=P2)		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase TAU	1	8	33.00	3.66	1.30
	2	8	80.25	3.01	1.06

Independent Samples Test

	Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Persentase Tr Equal variance assumed	.700	.417	-28.174	14	.000	-47.25	1.68	-50.85	-43.65
Equal variance not assumed			-28.174	13.494	.000	-47.25	1.68	-50.86	-43.64

Lampiran 6

T-Test

Group Statistics

Perlakuan (1=P1, 2=P2)		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase Embrio yang Membelah	1	8	46.9700	4.4338	1.5676
	2	8	60.8700	6.6230	2.3416

Independent Samples Test

	Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Persentase Embrio yang Membelah Equal variance assumed	1.124	.307	4.933	14	.000	-13.9000	2.8179	-19.9437	-7.8563
Equal variance not assumed			4.933	12.225	.000	-13.9000	2.8179	-20.0271	-7.7729

T-Test

Group Statistics

Perlakuan (1=P1, 2=P2)		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 2 sel	1	8	57.0775	6.8037	2.4055
	2	8	24.7313	12.8725	4.5511

Independent Samples Test

		Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 2 sel	Equal variance assumed	.923	.353	8.284	14	.000	32.3463	5.1477	21.3055	43.3870
	Equal variance not assumed			6.284	10.628	.000	32.3463	5.1477	20.9577	43.7248

Lampiran 8

T-Test

Group Statistics

Perlakuan (1=P1, 2=P2)		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 4 sel	1	8	26.5613	14.0817	4.9786
	2	8	25.3812	18.8199	5.8760

Independent Samples Test

		Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 4 sel	Equal variance assumed	.927	.352	.153	14	.880	1.1800	7.7016	-15.3382	17.6982
	Equal variance not assumed			.153	13.632	.880	1.1800	7.7016	-15.3801	17.7401

T-Test

Group Statistics

	Perlakuan (1=P1, 2=P2)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 8 sel	1	8	8.7350	9.8299	3.4754
	2	8	23.7837	14.0651	4.9728

Independent Samples Test

		Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 8 sel	Equal variance assumed	1.435	.251	-2.480	14	.028	-15.0487	6.0669	28.0609	-2.0366
	Equal variance not assumed			-2.480	12.521	.028	-15.0487	6.0669	28.2065	-1.8910

Lampiran 10

T-Test

Group Statistics

	Perlakuan (1=P1, 2=P2)	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 16 sel	1	8	7.7475	9.1273	3.2270
	2	8	20.1963	7.0448	2.4907

Independent Samples Test

		Levene's Test for equality of Variance		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Persentase Tingkat Pembelahan Embrio 16 sel	Equal variance assumed	9.43	.048	-3.054	14	.009	-12.4488	4.0764	21.1918	-3.7057
	Equal variance not assumed			-3.054	13.156	.009	-12.4488	4.0764	21.2447	-3.6528

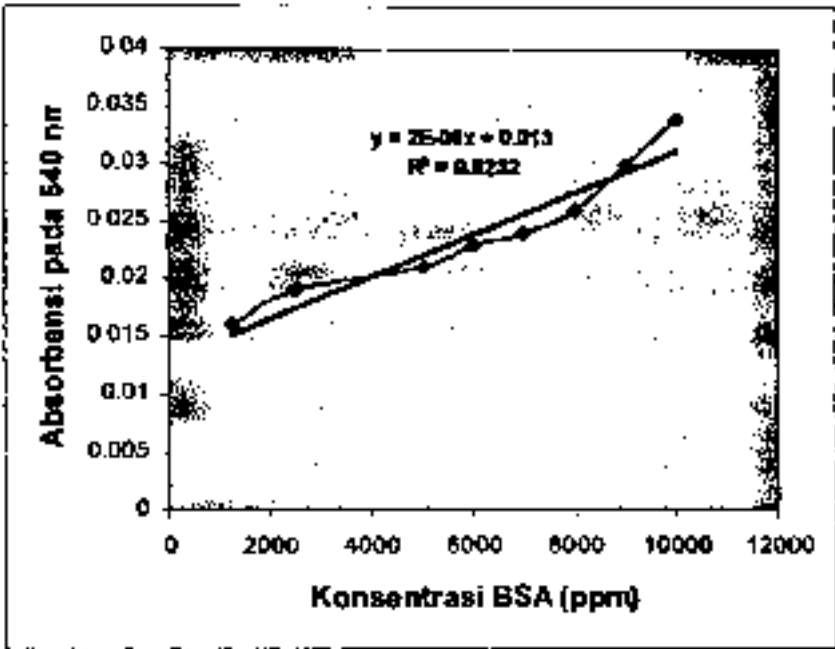
Lampiran 11.**Penghitungan Massa relatif (Mr) Insulin Like Growth Factor – I (IGF-I)****Penghitungan Massa relatif (Mr)****B=8 cm**

Mr Marker	Panjang Pita (A)	RF (A/B)	Log Mr
212	1.9	0.238	2.326
158	2.9	0.363	2.198
116	3.05	0.381	2.064
55.6	4.15	0.519	1.745
42.7	4.75	0.594	1.63
34.6	5.4	0.675	1.539
27	6.1	0.763	1.431
14.3	7.3	0.913	1.155

	Panjang Pita	RF	Log Mr	Mr
Pita 1	2.57	0.321	2.177	150.288
Pita 2	3.3	0.413	2.015	103.486
Pita 3	3.9	0.488	1.882	76.155
Pita 4	4.6	0.575	1.726	53.249
Pita 5	5.4	0.675	1.549	35.378
Pita 6	7.2	0.900	1.149	14.089
Pita 7	7.6	0.950	1.060	11.492

Lampiran 12.
Penentuan konsentrasi Insulin Like Growth Factor – I (IGF-I) plasma seminis kambing dengan metode biuret

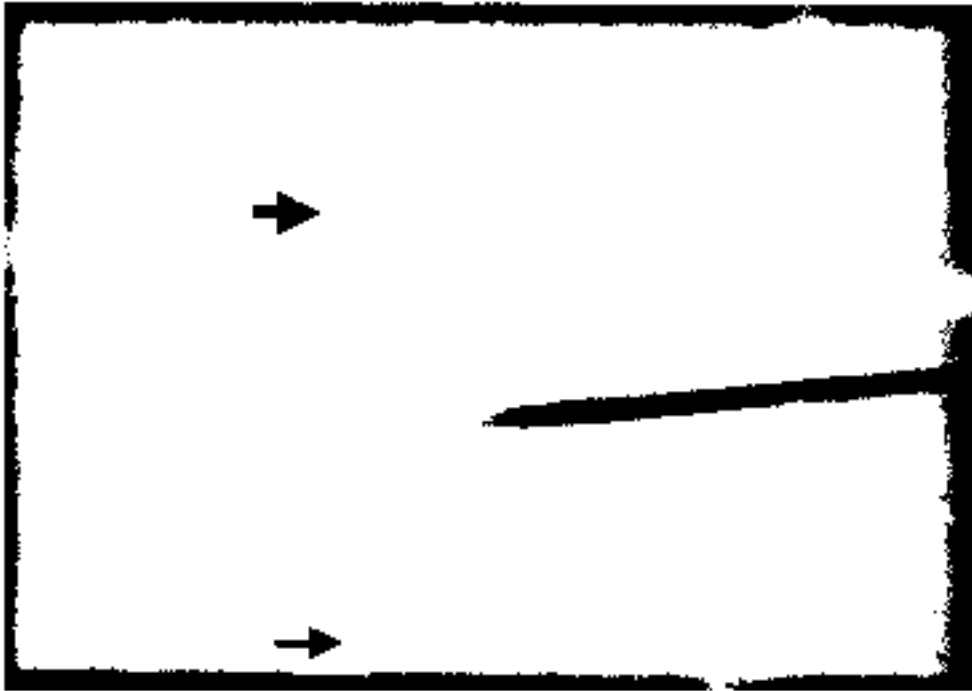
Standar(ppm)	Abs
10000	0.034
9000	0.030
8000	0.026
7000	0.024
6000	0.023
5000	0.021
2500	0.019
1250	0.016



Y			x4	ppm (ug/ml)	ng/ul
0.024	0.011	11000	5500	22000	
0.034	0.021	21000	10500	42000	
0.033	0.020	20000	10000	40000	
				104000	34666.67

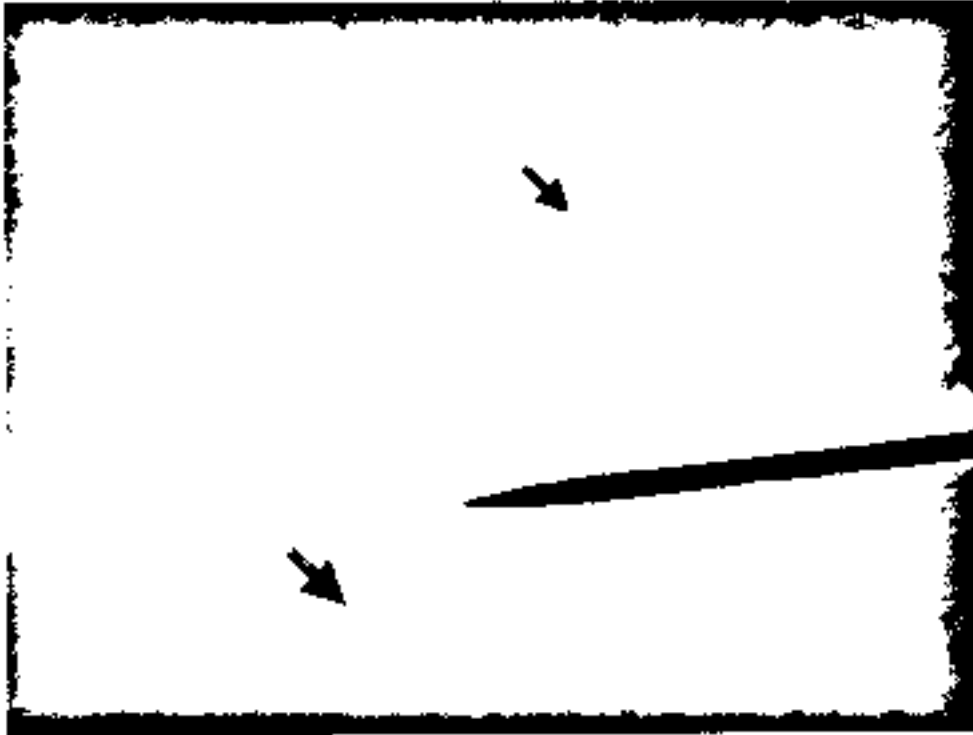
y (absorbansi)	x (konsentrasi ppm)
0.024	5500
0.034	10500
0.033	10000

Gambar 3. Spermatozoa hidup dan mati
(Pewarnaan eosin-negrosin, perbesaran 400x)



Keterangan : ➡ Spermatozoa hidup (tidak berwarna)
➡ Spermatozoa mati (berwarna merah)

**Gambar 4. Spermatozoa yang mengalami swelling
(Pewarnaan eosin-negrusin, perbesaran 400x)**



Keterangan : ➔ Spermatozoa yang membrannya utuh (ekor melingkar)
➔ Spermatozoa yang membrannya rusak (ekor lurus)

Gambar 5. Tudung Akrosom Spermatozoa



Keterangan :

- ➔ Tudung akrosom Spermatozoa yang utuh (hitam)
- ➔ Tudung akrosom Spermatozoa yang rusak

Gambar 6. Pembelahan Embrio

Keterangan :

a : Pembelahan dua sel

b : Pembelahan empat sel

c : Gagal membelah

Gambar 7. Tingkat Perkembangan Embrio



Keterangan :

- a : Pembelahan empat sel**
- b : Pembelahan delapan sel**
- c : Pembelahan enam belas sel**

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SI P A R A Y A

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL
PENELITIAN HIBAH PROYEK DUE LIKE BATCH III**

1. Judul : Isolasi Dan Karakterisasi Biologi Insulin Like Growth Factor I
Plasma Seminalis Kambing Sebagai Media Pencucian Spermatozoa
(Inovasi Teknik Produksi Embrio Secara In Vitro)

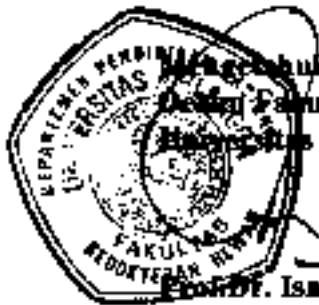
2. Ketua Peneliti :

Nama lengkap dengan gelar	: Tatik Hernawati, Msi, Drh.
Jenis Kelamin	: Perempuan
Pangkat/Golongan	: Pembina / IV a
NIP	: 131 653 459
Jabatan	: Lektor Kepala
Fakultas	: Kedokteran Hewan

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu Penelitian : 6 bulan

Biaya yang diajukan : Rp. 30.000.000,-



Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Prof. Dr. Ismudiono, MS, Drh

NIP. 130 687 297

Surabaya, 15 Desember 2006

Ketua Peneliti

Tatik Hernawati, Msi, Drh

NIP. 131 653 459



Titik Tri Tjahjandari, Ph.D

NIP. 131 801 627

RINGKASAN PENELITIAN

Judul Penelitian : Isolasi dan Karakterisasi Biologi Insulin Like Growth Factor I Plasma Seminalis Kambing Sebagai Media Pencucian Spermatozoa (Inovasi Teknik Produksi Embrio Secara In Vitro)

Ketua Peneliti : Tatik Hernawati MSi, Drh.

Anggota Peneliti : Prof.Dr. Soehartojo Hardjopranjoto, MS,Drh.
Indah Norma Triana MSi, Drh.

Fakultas/Puslit : Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Sumber Biaya : DUE-LIKE BACTH III

Plasma seminalis terdiri dari bermacam-macam komponen biokimia yang spesifik mengatur fungsi spermatozoa. Salah satu komponen plasma seminalis adalah Insulin Like Growth Factor I (IGF – I). Insulin Like Growth Factor I berbentuk kompleks yaitu berikatan dengan molekul lain yaitu Insulin Like Growth Factor Binding protein (IGFBP) dan Acid Label Subunit(ALS) dengan berat molekul 150 kDa. Protein IGF –I dapat diidentifikasi dengan metode elektroforesis.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui persentase motilitas, hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh, konsentrasi malondialdehid, pembelahan embrio dan tingkat perkembangan embrio. Sedangkan manfaat penelitian ini adalah meningkatkan kualitas spermatozoa kambing pada medium pencucian dengan menggunakan Insulin Like Growth Factor I sehingga pada proses fertilisasi in vitro di dapat embrio yang berkualitas.

Penelitian ini menggunakan semen kambing untuk melakukan identifikasi dan isolasi protein IGF –I. Semen kambing yang ditampung diperiksa kualitasnya, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 10 menit untuk memisahkan plasma seminalisnya. Identifikasi dilakukan dengan metode Native PAGE 12 % dan isolasi dilakukan dengan metode elektroelusi.

Karakterisasi protein IGF -I dilakukan dengan metode Western Blot. Isolat IGF -I yang diperoleh kemudian diukur konsentrasinya dengan metode biuret dan selanjutnya dilakukan aplikasi pada spermatozoa secara in vitro.

Semen ditampung diperiksa kualitasnya kemudian dipisahkan dari plasma seminalis dengan cara sentrifugasi, kemudian diambil 2 tabung , tabung I diisi spermatozoa yang ditambah BO dan tabung II diisi spermatozoa yang ditambah dengan isolat IGF - I Tabung I dan II diinkubasi selama 30 menit kemudian diperiksa motilitas, hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh dan konsentrasi malondialdehid. Spermatozoa pada tabung I dan II kemudian dilakukan invitro fertilisasi, selanjutnya diperiksa pembelahan embrio dan tingkat perkembangan embrio.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata terhadap motilitas, hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh dan konsentrasi malondialdehid antara perlakuan I dan perlakuan II ($P < 0,05$). Begitu juga hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap persentase pembelahan embrio dan tingkat perkembangan embrio 2 sel, 8 sel, 16 sel antara perlakuan I dan perlakuan II ($P < 0,05$). Tetapi pada tingkat perkembangan embrio 4 sel tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah protein Insulin Like Growth Factor - I Plasma Seminalis kambing dapat meningkatkan kualitas spermatozoa dengan indikator motilitas, hidup, membran plasma utuh, tudung akrosom utuh dan menurunkan konsentrasi malondialdehid serta meningkatkan persentase pembelahan embrio dan tingkat perkembangan embrio .